



**Universidade de Aveiro**  
**2013**

Departamento de Química

**Joana Alexandra  
Rodrigues Trindade**

**Métodos alternativos de deteção de  
*Salmonella* e *Listeria monocytogenes***



**Universidade de Aveiro**  
**2013**

Departamento de Química

**Joana Alexandra  
Rodrigues Trindade**

**Métodos alternativos de deteção de  
*Salmonella* e *Listeria monocytogenes***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia – Ramo de Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Ivonne Delgadillo, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Adelaide Almeida, Professora Auxiliar no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

## **O júri**

presidente

**Prof<sup>a</sup>. Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço**  
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof<sup>a</sup>. Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo**  
Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da  
Universidade de Aveiro

**Prof<sup>a</sup>. Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha**  
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## **Agradecimentos**

Gostaria de expressar o meu reconhecimento a várias pessoas que das mais variadas formas, tornaram possível a realização deste trabalho.

Às Professoras Doutoras Ivonne Delgadillo e Adelaide Almeida por terem aceitado orientar esta investigação e por o terem feito de uma forma tão motivadora. A orientação científica, a disponibilidade, o empenho, a confiança depositada e os incentivos dirigidos, contribuíram decisivamente para que a mesma chegasse a bom termo.

Ao Engenheiro Vasco Paixão da Bruker agradeço o interesse demonstrado por este trabalho aquando da disponibilização do equipamento de FTIR na Labinter, desta forma tudo se tornou mais fácil e acessível.

À Catarina Moreirinha agradeço toda a amizade, todo o carinho e toda a orientação científica. Mais pessoas no mundo houvessem iguais a ti, e garantidamente teríamos um mundo bastante melhor.

À Sofia e ao Pedro agradeço a amizade e confiança evidenciada ao longo destes 6 anos de trabalho, só assim pude crescer como pessoa e como profissional. Agradeço também a disponibilidade de efetuar o mestrado na Labinter.

À Laurinda, Célia, Inês e Joana, as minhas colegas de trabalho, agradeço acima de tudo o companheirismo e ajuda que foi fundamental nesta etapa da minha vida.

Aos meus amigos, que não preciso de nomear, pois eles sabem bem quem são, agradeço todas as palavras amigas quando a minha falta de confiança era tão evidente, nem imaginam como o vosso encorajamento foi importante para encerrar este ciclo.

Aos meus sobrinhos, Afonso e Maria Beatriz, agradeço todos os miminhos, foram sem dúvida o meu doce nas horas amargas.

Aos meus pais e irmã agradeço o incentivo, a confiança, o amor e ajuda que me deram para chegar onde cheguei hoje. Sem eles, não estaria aqui.

Por fim, mas não menos importantes, agradeço ao Nuno a paciência, a amizade, o amor e a força que me transmitiu em todos os momentos de desânimo. Ao nosso filho, Manoel, mais do que um agradecimento fica o meu pedido de desculpas pelo tempo que não te dediquei por forma a poder cumprir esta etapa. Foste a minha principal força.

## Palavras-chave

Análise microbiológica, Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier, Análise de Componentes Principais, Contaminação Microbiológica, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*.

## Resumo

Atualmente vivemos numa sociedade moderna que exige qualidade nos produtos que consome. A maioria dos produtos que consumimos já não é proveniente de produção pessoal mas sim de um grande circuito de produção e distribuição promovido pela globalização. O fácil acesso a uma grande variedade de produtos dificulta o controlo de salubridade destes, uma vez que os efeitos das falhas de salubridade atingem muitas pessoas de diferentes países e até de diferentes continentes. A qualidade microbiológica dos alimentos tornou-se portanto um fator bastante importante para os operadores do setor alimentar, bem como para as autoridades competentes. A deteção atempada de microrganismos patogénicos torna-se fundamental, pois é uma forma de evitar infeções alimentares. De entre as infeções mais importantes reportadas nos últimos anos encontram-se a salmonelose (provocadas por bactérias do género *Salmonella*), e a listeriose (provocadas por *Listeria monocytogenes*). Os métodos tradicionais (ISO 6579:2002 e ISO 11290-1:1996, respectivamente) para pesquisa de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* requerem cerca de uma semana de análise, pelo que muitas vezes é necessário recorrer a métodos mais céleres e menos dispendiosos.

A espectroscopia de infravermelho (MIR) tem sido usada desde a década de 1980 como um método complementar para diferenciação de bactérias, pois o espectro de absorvância no infravermelho representa um “fingerprint” que é característico de uma substância química ou biológica. Esta técnica apresenta diversas vantagens no campo da classificação e identificação microbiológica: é um método muito rápido (praticamente não exige manipulação da amostra e permite obter espectros em apenas alguns segundos), não destrutivo, pode ser estudada qualquer amostra em qualquer estado, pode ser usado com diferentes finalidades (como por exemplo, deteção, enumeração, classificação e identificação) e permite a diferenciação de níveis taxonómicos (serotipo, estirpe, espécie ou género). Neste trabalho foi avaliado o potencial de espectroscopia de infravermelho (MIR), na confirmação de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em produtos alimentares. Desta forma, foram utilizados isolados de *Salmonella* e *Listeria* (identificados pelo sistema API) provenientes de alimentos (e.g. queijos, enchidos e pratos confeccionados). De seguida analisaram-se diretamente por MIR as colónias provenientes do meio OCLA (*Listeria*) e do meio XLD (*Salmonella*). No caso da *Salmonella* o API não permite distinguir as diferentes espécies. A análise multivariada de espectros permitiu diferenciar as espécies de *Listeria* bem como a *Salmonella* das restantes *Enterobacteriaceae* (e.g. *Proteus* spp., *Shigella* spp. e *Citrobacter* spp.).

Com este estudo concluiu-se que a técnica de MIR permite uma confirmação rápida dos dois microorganismos patogénicos, *Salmonella* e *Listeria*, e permite distinguir diferentes espécies de *Listeria* e de *Enterobacteriaceae*.

## Keywords

Microbial analysis, Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Principal Component Analysis, Microbial Contamination, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*.

## Abstract

Today we live in a modern society that demands for higher quality foods. Most of the products we consume are not from personal production, but from a great circuit of production and distribution promoted by globalization. The easy access to a variety of products difficult their control and the microbiological quality of food has become a very important factor for food industries as well as to the competent authorities. Early detection of pathogenic microorganisms becomes crucial in order to prevent foodborne diseases. *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* are important foodborne pathogenic microorganisms. The detection methods of both microorganisms (ISO 6579:2002 and ISO 11290-1:1996, respectively) are quite lengthy, taking about 8 days to obtain results. Consequently, it is extremely important to validate faster methods with lower costs for laboratories.

Vibrational spectroscopic techniques, infrared spectroscopy (IR) and Raman spectroscopy, have been used since the 1980s as complementary methods for bacterial differentiation owing to their rapid "fingerprinting" capabilities and the molecular information that they can provide. These techniques present several advantages in the microbiological classification and identification fields: they are fast (requiring virtually no sample processing), non-destructive, multi-purpose (e.g., detection, enumeration, classification, identification), discriminating at different taxonomic levels (serotype, strain, species or genus). In this study it was evaluated the potential of mid infrared spectroscopy (MIR), to confirm the presence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in food. For this, we isolated *Salmonella* and *Listeria* (identified by API system) from food products (cheeses, sausages and prepared dishes). Then, colonies from OCLA medium (*Listeria*) and from XLD medium (*Salmonella*) were analysed directly with MIR. In the case of *Salmonella*, the API does not allow to discriminate the different species. The multivariate analysis of the spectra allowed the distinction of the different *Listeria* species and the differentiation of *Salmonella* from the other *Enterobacteriaceae* (e.g. *Proteus* spp., *Shigella* spp., *Citrobacter* spp.).

We conclude that MIR allows the rapid confirmation of two important food pathogens, *Salmonella* and *Listeria*, and even permits to differentiate different species of *Listeria* and *Enterobacteriaceae*.

# Índice

1.	Introdução .....	1
1.1.	Infeção por <i>Salmonella</i> spp. e por <i>Listeria monocytogenes</i> .....	2
1.2.	Caraterização das bactérias em estudo .....	6
1.2.1.	<i>Salmonella</i> spp. ....	6
1.2.2.	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	6
1.3.	Legislação Europeia e Portuguesa – Qualidade Alimentar .....	7
1.3.1.	Legislação para detecção de <i>Salmonella</i> spp. e de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	9
1.4.	Validação de métodos microbiológicos para análise de alimentos .....	9
1.5.	Métodos rápidos de análise microbiológica .....	10
1.6.	Análise por espectroscopia de infravermelho .....	12
1.7.	Análise multivariada (PCA) .....	13
2.	A Labinter .....	14
3.	Métodos Normalizados .....	18
3.1.	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. – ISO 6579:2002 .....	18
3.2.	Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> – ISO 11290-1:1996 .....	22
4.	Objectivos .....	28
5.	Material e Métodos .....	29
5.1.	Preparação das amostras .....	29
5.1.1.	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. ....	29
5.1.2.	Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	30
5.2.	Recolha de estirpes .....	32
5.3.	Reativação das estirpes microbianas .....	33
5.3.1.	<i>Salmonella</i> spp. ....	33
5.3.2.	<i>Citrobacter</i> , <i>Proteus</i> e <i>Shigella</i> .....	33
5.3.3.	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	33
5.3.4.	<i>Listeria innocua</i> e <i>Listeria ivanovii</i> .....	34
5.4.	Análise por espectroscopia infravermelho médio.....	34
5.5.	Análise de componentes principais .....	34
6.	Resultados e Discussão .....	35
6.1.	<i>Salmonella</i> spp. ....	36
6.2.	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	41
7.	Conclusões .....	46
8.	Referências Bibliográficas .....	48

## Listagem de Figuras:

Figura 1: Colónias típicas de <i>Salmonella</i> spp., em meio seletivo XLD agar .....	19
Figura 2: Colónias típicas de <i>Salmonella</i> spp., em meio seletivo chromosalmonella ..	20
Figura 3: Colónias típicas de <i>Salmonella</i> spp., em meio seletivo verde brilhante agar .....	20
Figura 4: Leitura API 20E da Biomerieux .....	21
Figura 5: Galeria de <i>Salmonella</i> spp., em galeria API 20E da Biomerieux .....	21
Figura 6: Teste de confirmação oxidase .....	21
Figura 7: Confirmação serológica de <i>Salmonella</i> spp. ....	22
Figura 8: Colónias típicas de <i>Listeria monocytogenes</i> em meio seletivo OCLA .....	23
Figura 9: Colónias típicas de <i>Listeria</i> spp., em meio seletivo Palcam .....	24
Figura 10: Meio agar colúmbia 5% - Existência de hemólise .....	25
Figura 11: Leitura API <i>Listeria</i> .....	26
Figura 12: Galeria de <i>Listeria monocytogenes</i> em galeria API <i>Listeria</i> .....	26
Figura 13: RAPIDEC <i>L.mono</i> .....	27
Figura 14: Média das réplicas referentes aos espectros de infravermelho de cada bactéria estudada na zona de $1200 - 980 \text{ cm}^{-1}$ .....	36
Figura 15: Espectros de infravermelho de <i>Salmonella</i> .....	37
Figura 16: Estrutura primária de uma subunidade de peptidoglicana .....	38
Figura 17: Espectros de infravermelho das diferentes <i>Enterobacteriaceae</i> s .....	39
Figura 18: Diagrama das coordenadas fatoriais (PC1 vs PC2) relativo a colónias de <i>Salmonella</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp., <i>Shigella</i> spp. e <i>Proteus</i> spp. ....	39
Figura 19: Mapa das contribuições fatoriais (PC1 vs PC2) relativo a colónias de <i>Salmonella</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp., <i>Shigella</i> spp. e <i>Proteus</i> spp. ....	40
Figura 20: Espectros de infravermelho de bactérias de <i>Listeria</i> .....	41
Figura 21: Espectros de infravermelho das diferentes espécies de <i>Listeria</i> .....	42
Figura 22: Diagrama das coordenadas fatoriais (PC1 vs PC2) relativo a colónias de <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Listeria innocua</i> e <i>Listeria ivanovii</i> .....	43
Figura 23: Mapa das contribuições fatoriais (PC1 vs PC2) relativo a colónias de <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Listeria innocua</i> e <i>Listeria ivanovii</i> .....	43



## Listagem de Tabelas:

Tabela 1: Surto e casos de doenças de origem alimentar registados pela CDC durante o ano 2008 .....	4
Tabela 2: Surto e casos de doenças de origem alimentar registadas pela CDC durante o ano 2008. Referência à etiologia dos surtos quando identificada .....	5
Tabela 3: Ensaios realizados incluídos no âmbito da acreditação (L0562) .....	16
Tabela 4: Ensaios realizados não incluídos no âmbito da acreditação .....	17
Tabela 5: Valores de absorção de diferentes grupos funcionais no infravermelho .....	35
Tabela 6: Diferenciação bioquímica das espécies de <i>Listeria</i> .....	45

## **Abreviaturas:**

ALOA – Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti

APT – Água peptonada tamponada

CDC – Center for Disease Control and Prevention (Estados Unidos da América)

CE – Comissão Europeia

EFSA – European Food Safety Authority

EN – European Committee for Standardization

ERSAR – Entidade Reguladora dos Serviços de Água e Resíduos

HPE – Public Health England

IPAC – Instituto Português de Acreditação

ISO – International Organization for Standardization

MI – Método interno

MIR – Mid-infrared spectroscopy

MKTTn – Muller-Kauffmann tetrathionate novobiocin

NP – Norma Portuguesa

PCA – Análise de componentes principais

RVS – Rappaport-vassiliadis medium with soya

TSA – Tryptic soy agar

TSYEA – Tryptone soya yeast extract agar

VBA – Verde brilhante agar

XLD – Xylose lysine deoxycholate agar

# 1. Introdução

Nos últimos anos, diversos fatores, tanto económicos como socioculturais determinaram alterações substanciais nos hábitos alimentares da população, tendo os conceitos e as formas de restauração evoluído, moldando-se ao desenvolvimento da sociedade. Entre os factores mais determinantes na mudança que têm conduzido a uma alteração de costumes alimentares, tanto na forma como no tipo de alimentos que a população procura, incluem-se: (1) o crescimento da população residente em meios urbanos; (2) a distância e consequente tempo médio de deslocação entre a residência e o local de trabalho ou a escola; (3) o aumento de percentagem de mulheres no mercado de trabalho; (4) o aumento de poder de compra; (5) as preocupações dietéticas (Baptista *et al*, 2005).

Esta mudança obrigou a uma maior responsabilização de todo o pessoal da indústria alimentar, em particular dos manipuladores de alimentos. A educação, formação e motivação de manipuladores de alimentos constituem valores indispensáveis a uma boa política de prevenção. O cumprimento correto das boas práticas de fabrico e a formação profissional do pessoal responsável pela manipulação dos alimentos limitam o número de toxinfecções alimentares.

Por estes motivos, a segurança alimentar é atualmente uma preocupação dominante em todo o mundo, inserindo-se nos principais problemas com que as autoridades, os operadores económicos e os próprios consumidores se confrontam diariamente.

Os alimentos potencialmente perigosos possibilitam uma multiplicação rápida dos microrganismos por apresentarem alto teor em proteína ou hidratos de carbono, elevada humidade e baixa acidez, tais como carne, peixe, marisco, leite, queijos, ovos e vegetais (Monteiro, 2010). A deteção e controlo de microrganismos patogénicos nestes alimentos é importante (Novais, 2010).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, uma doença de origem alimentar é uma doença, geralmente de natureza infecciosa ou tóxica, transmitidas através da ingestão de

alimentos ou de água. Estima-se que, por ano, cerca de 30% da população dos países industrializados sofra este tipo de doença (World Health Organization Staff, 1997 e 2008).

De entre as doenças transmitidas por alimentos, as infeções são das mais importantes. A gravidade deste tipo de doenças pode variar desde sintomas leves a sequelas crónicas, podendo mesmo ser mortais. Os seres humanos podem adquirir estas infeções através da ingestão de alimentos contaminados, diretamente pelo contacto com animais doentes ou portadores, ou através de outras fontes ambientais (EFSA, 2011).

De entre as infeções mais importantes reportadas nos últimos anos estão a Salmonelose (provocadas por bactérias do género *Salmonella*) e a listeriose (provocadas por *Listeria monocytogenes*) (EFSA, 2011).

### **1.1. Infeção por *Salmonella* spp. e por *Listeria monocytogenes***

*Salmonella* spp. é um dos microrganismos mais amplamente distribuídos na natureza, sendo o homem e os animais os seus principais reservatórios. Cresce no trato intestinal dos seres humanos e outros animais incluindo aves. Tem sido observada a ocorrência de serotipos regionais (Shinohara *et al.*, 2008). É considerado como um dos principais agentes envolvidos em surtos de origem alimentar. Este microrganismo pode causar gastroenterite ligeira a septicemia grave ou infeções locais (Dias *et al.*, 2012). As principais manifestações clínicas são septicemias, náuseas, vômitos, febres altas e diarreia.

O aumento da incidência da salmonelose provocada por alimentos contaminados, tais como, carne, frango, leite ou ovos, bem como vegetais, demonstra que, na atualidade, apesar dos avanços tecnológicos alcançados, este problema ainda ocorre mundialmente. A ampla distribuição de *Salmonella* spp. entre os animais, a existência de portadores assintomáticos e a sua permanência no ambiente e nos alimentos contribuem para que este microrganismo assuma um papel de grande relevância na saúde pública mundial e, portanto devem ser adoptados programas permanentes de controlo (Shinohara *et al.*, 2008).

Anualmente e segundo o “Center for Disease Control e Prevention” (CDC, 2012), são relatados cerca de 42.000 casos de salmonelose nos Estados Unidos. No entanto, o número de infecções pode ser 29 vezes maior, visto que muitos casos leves não são diagnosticados ou relatados. Na Europa, *Salmonella* spp. foi considerada em 2008 a principal causa de mortalidade associada a surtos de origem alimentar (Dias *et al*, 2012). De entre os diferentes tipos de *Salmonella*, os serotipos *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis são os mais comuns (CDC, 2012). Os surtos de salmonelose são mais comuns no verão do que no inverno, e mais frequentes em crianças (CDC, 2012). A taxa de infecções diagnosticadas em crianças com menos de cinco anos de idade é maior do que a taxa em todas as outras faixas etárias. As crianças, os idosos e as pessoas imunodeprimidas são mais propensos a desenvolver infecções graves (CDC, 2012). Estima-se que cerca de 400 pessoas morrem todos os anos com salmonelose aguda (CDC, 2012).

A infecção por *Listeria monocytogenes* (listeriose) só foi reconhecida em 1980 como uma doença de origem alimentar (CDC, 2013). Embora com uma incidência menor do que a *Salmonella* spp., o aparecimento de casos de infecções por *Listeria monocytogenes* nas últimas décadas tem trazido preocupações, por esta bactéria poder provocar danos severos ou mesmo fatais em bebês, crianças, mulheres grávidas, idosos e em indivíduos imunodeprimidos. Trata-se de uma bactéria invasiva nas fases vulneráveis da vida. A listeriose normalmente é uma doença leve em mulheres grávidas, no entanto pode ter consequências graves para o feto ou recém-nascido, incluindo a morte fetal, parto prematuro, septicemia neonatal, meningite e morte. A infecção por listeriose é rara, no entanto, a hospitalização por esta bactéria é mais comum do que com outras infecções de origem alimentar, e trata-se da terceira causa de morte entre as principais bactérias transmitidas por alimentos (CDC, 2013). Entre 1996 e 2001, houve uma diminuição considerável (24%) de casos de infecção por *Listeria monocytogenes*, mas desde então até à data de hoje não se verificaram alterações significativas (CDC, 2013). Em 2011, um melão contaminado com *Listeria monocytogenes*, provocou nos EUA o maior surto de origem alimentar dos últimos 90 anos. As autoridades de saúde atuaram rapidamente, pelo que o melão foi retirado do mercado, e desta forma foi impedido o aumento do número de casos (CDC, 2013). Segundo a “European Food Safety Authority” (EFSA), foram diagnosticados

na Europa, durante o ano 2011, cerca de 1470 casos de listeriose, com uma taxa de mortalidade de 12,7% (EFSA, 2013).

A origem da contaminação dos alimentos por *Listeria monocytogenes* é por vezes difícil de determinar dado o carácter ubiquitário deste microrganismo, mas um dos fatores para a não diminuição destes casos, é o constante desrespeito pelas boas práticas de higiene, contaminação cruzada, manipulação inadequada e tratamento térmico insuficiente (EFSA, 2013). No entanto, são já vários os alimentos incriminados como veículos de infeção por *Listeria monocytogenes*, destacando-se os alimentos prontos a comer, como pratos confeccionados, queijos de pasta mole ou dura, produtos avícolas, produtos cárneos especialmente derivados de porco, produtos de salsicharia, patê, vegetais e produtos lácteos, tais como gelados e natas (Esteves, 2005).

**Tabela 1** – Surtos e casos de doenças de origem alimentar registados pela CDC durante o ano 2008.

	Número
<b>Casos divulgados</b>	1 034
<b>Casos de doença</b>	23 152
<b>Hospitalizações</b>	1 276
<b>Mortes</b>	22

**Tabela 2** – Surtos e casos de doenças de origem alimentar registados pela CDC durante o ano 2008. Referência à etiologia dos surtos quando identificada nos Estados Unidos da América.

<b>Etiologia</b>	<b>Número</b>
<i>Salmonella</i> spp.	797
<i>Escherichia coli</i> , produtora de toxina Shiga	214
<i>Campylobacter</i>	25
<i>Staphylococcus</i> Enterotoxina	12
<i>Clostridium botulinum</i>	9
<i>Listeria</i>	25
Outras causas bacterianas	9
Substâncias Químicas e Toxinas	15
Parasitas	2
Norovirus	90
Outras causas virais	4
Múltiplas causas	34
Total	1276

Durante o ano de 2008, mais de 1200 pessoas foram hospitalizadas devido a doenças transmitidas por ingestão de produtos alimentares (Tabela 2) e das 22 mortes que foram atribuídas (Tabela 1) a *Salmonella* spp., foi a responsável pela sua maioria (13), seguida da *Listeria* e da *Escherichia coli* (CDC, 2011).

Devido ao consequente aumento deste tipo de infeções, torna-se imperativo que a análise microbiológica dê respostas em tempo útil, de forma a minimizar os danos.

## **1.2. Caracterização das Bactérias em Estudo**

### **1.2.1. *Salmonella* spp.**

As bactérias do género *Salmonella* pertencem à família das *Enterobacteriaceae*, são gram-negativas, em forma de pequenos bacilos, não esporuladas, não capsuladas, anaeróbias facultativas, fermentam a glucose, a maioria não fermenta a lactose, reduzem o nitrato a nitrito, são oxidase negativas (Grimont *et al.* 2000) e têm a capacidade de formar biofilmes (Thorns e Woodward, 2000). São bactérias que se encontram no trato intestinal de animais de sangue quente, sendo estes os principais responsáveis pela sua introdução no meio ambiente (Murray, 2000).

Esta bactéria pode contaminar todo o tipo de alimentos, no entanto, a contaminação da superfície da carne é geralmente de pouca importância, uma vez que uma cozedura adequada vai destruir o microrganismo, pois possui uma resistência térmica muito baixa ( $T > 60^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos). No entanto, a manipulação de carne contaminada pode resultar na contaminação das mãos, mesas, utensílios de cozinha, entre outros, que se não forem devidamente higienizados podem contaminar outros alimentos que já se encontram confeccionados. As contaminações também podem surgir de manipuladores de alimentos, que sejam portadores assintomáticos.

As contaminações por *Salmonella* spp., podem ser evitadas através de boas práticas de higiene e saneamento, de confeção adequada ( $T > 60^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos), do correto armazenamento (refrigeração próxima dos  $4^{\circ}\text{C}$ ) e evitar contaminações cruzadas.

### **1.2.2. *Listeria monocytogenes***

A *L. monocytogenes* é um bacilo curto Gram-positivo,  $0,5\ \mu\text{m}$  de diâmetro,  $1 - 2\ \mu\text{m}$  de comprimento, não capsulado e não esporulado, móvel por meio de flagelos peritricos à temperatura de  $20 - 25^{\circ}\text{C}$ . É anaeróbio facultativo, hemolítico, catalase positiva e oxidase negativa. É um dos poucos microrganismos patogénicos de origem alimentar que consegue



crescer a valores de atividade da água ( $a_w$ ) inferiores a 0,93, que possui a capacidade de se multiplicar numa gama ampla de temperaturas (tolera temperaturas de refrigeração e congelação), a valores de pH entre 4,5 – 9,2 e que tolera elevadas concentrações salinas, tendo sido referida a sua multiplicação em meios com concentrações elevadas de NaCl (Esteves, 2005; Farber *et al*, 1991). Uma característica importante desta bactéria é a capacidade de formar biofilmes em associação com outros microrganismos o que a torna mais resistente à desinfeção (Ruiz-Bolivar *et al.*, 2008).

As contaminações por *Listeria monocytogenes* podem persistir por um longo período de tempo (Miettinen *et al*, 1999; Vogel *et al*, 2001). *Listeria monocytogenes* apresenta características que levam à sua sobrevivência nas unidades fabris, apresentando-se uma ameaça à segurança alimentar (Vázquez-Boland *et al*, 2001). Estas contaminações podem ser evitadas através de boas práticas de higiene e saneamento, de confeção adequada ( $T > 70^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos) e evitar contaminações cruzadas.

### **1.3. Legislação Europeia e Portuguesa – Qualidade Alimentar**

Atualmente, vivemos numa sociedade moderna que exige qualidade nos produtos que consome. A maioria dos produtos que consumimos já não é proveniente de produção pessoal, mas sim de um grande circuito de produção e distribuição promovido pela globalização. O fácil acesso a uma grande variedade de produtos, dificulta o controlo de salubridade destes, uma vez que os efeitos das falhas de salubridade atingem muitas pessoas de diferentes países e até de diferentes continentes. A qualidade microbiológica dos alimentos tornou-se, portanto um factor bastante importante para os operadores do sector alimentar, bem como para as autoridades competentes.

Na União Europeia, foram estabelecidos critérios microbiológicos para alimentos específicos. Sendo estes critérios aplicados ao longo de toda a cadeia alimentar, desde o produtor de alimentos, às indústrias de importação e exportação. Desta forma, os géneros alimentícios não devem conter microrganismos, toxinas e metabolitos que representem risco para a saúde pública.

A 28 de Janeiro 2002, surgiu o Regulamento (CE) N.º178/2002, que estabelece requisitos de segurança alimentar, de acordo com os quais os géneros alimentícios não seguros não poderão ser comercializados. O Regulamento (CE) n.º 2073/2005 de 15 de Novembro, revogado pelo 1441/2007 de 5 Dezembro, é relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. O Regulamento (CE) n.º 853/2004, de 29 de Abril, estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal, com critérios microbiológicos para leite cru de vaca e de outras espécies. A portaria n.º65/90 de 26 de Janeiro (revogada) refere-se aos critérios microbiológicos para apreciação das características dos bolos e cremes de pastelaria.

É de salientar que o Regulamento n.º1441/2007, estabelece critérios microbiológicos para certos microrganismos e as regras de execução a cumprir pelos operadores das empresas do setor alimentar quando aplicarem as medidas de higiene gerais e específicas, tais como:

- Critérios de higiene dos processos
- Carne e produtos derivados
- Leite e produtos láteos
- Ovoprodutos
- Produtos da pesca
- Produtos hortícolas, frutas e produtos derivados
- Regras em matéria de amostragem e preparação de amostras para análise
- Regras gerais em matéria de amostragem e preparação de amostras para análise
- Amostragem para análise bacteriológica em matadouros e em estabelecimentos de produção de carne picada e de preparados de carne.

### **1.3.1. Legislação para detecção de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes***

A legislação em vigor, Regulamento (CE) n.º 1831/2003 de 5 de Dezembro, estabelece critérios microbiológicos para certos microrganismos, incidindo particularmente sobre *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. Os métodos de pesquisa destes dois microrganismos são a ISO 6579:2002 e ISO 11290-1:1996, respetivamente. Tratam-se de métodos normalizados, que permitem apenas detetar a presença destes dois microrganismos, não permitindo a sua quantificação. Consequentemente, havendo uma única colónia suspeita é necessário proceder à sua confirmação. A detecção dos dois microrganismos leva cerca de 8 dias sendo os custos elevados, pelo que se torna pertinente validar métodos mais céleres e menos dispendiosos.

## **1.4. Validação de Métodos Microbiológicos de Análise de Alimentos**

A validação do método é a confirmação, através de exame e apresentação de evidência objetiva, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização pretendida são satisfeitos.

De acordo com a Norma ISO 17025:2005, requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração, todos os laboratórios que queiram implementar os seus próprios métodos de análise têm que ter em consideração o ponto 5.4 Métodos de ensaio e calibração e validação dos métodos descrito nesta norma.

Os laboratórios devem utilizar métodos e procedimentos adequados para a realização de todos os ensaios dentro do seu âmbito de atividade. Os procedimentos têm que incluir amostragem, manuseamento, transporte, armazenamento e preparação dos itens a ensaiar e, quando apropriado, uma estimativa da incerteza de medição bem como técnicas estatísticas para análise dos dados de ensaio.

A introdução de métodos de ensaio desenvolvidos pelo laboratório para seu próprio uso deve ser uma atividade planeada e atribuída a pessoal qualificado, dotado dos recursos apropriados. Os planos devem ser atualizados à medida que se efetua o desenvolvimento e deve ser assegurada uma comunicação efetiva entre todo o pessoal envolvido.

Os laboratórios devem validar métodos não normalizados, métodos concebidos ou desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados utilizados fora do âmbito de utilização previsto e extensões ou modificações de métodos normalizados, para confirmar que os métodos são adequados à utilização prevista. Para satisfazer as necessidades de uma dada aplicação ou campo de aplicação, esta validação deve ser tão exaustiva quanto o necessário. O laboratório deve registar os resultados obtidos, o procedimento utilizado para a validação e uma declaração quanto à adequação do método para a utilização pretendida.

A gama e a exatidão dos valores que podem ser obtidos através de métodos validados (por exemplo, a incerteza dos resultados, o limite de deteção, a seletividade do método, a linearidade, os limites de repetibilidade e/ou reprodutibilidade, a robustez a influências externas e/ou a sensibilidade cruzada a interferências da matriz da amostra/do objeto de ensaio), tal como avaliado para a utilização pretendida, devem ser relevantes face às necessidades do cliente (NP EN ISO/IEC 17025).

## **1.5. Métodos Rápidos de Análise Microbiológica**

Os métodos tradicionais (Normas ISO) para pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp., requerem cerca de uma semana de análise, pelo que muitas vezes é necessário recorrer a métodos mais céleres.

Existem no mercado vários métodos para pesquisa de *Salmonella* spp., e *Listeria monocytogenes* (e.g IQ-Check<sup>TM</sup> Real Time PCR kit's (da BIO-RAD) e o Mini-Vidas® (da Biomerieux), no entanto, nem todos se encontram monetariamente ao alcance dos laboratórios de análise devido ao seu elevado custo.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma ferramenta poderosa pois garante uma detecção rápida de bactérias patogénicas, quando comparado com os métodos de referência disponíveis na monitorização industrial. Devido à sua alta especificidade, esta tecnologia é atualmente a única a garantir um resultado fiável num prazo de 24 h ou menos (Dorak, 2007).

A tecnologia PCR já existe há mais de 20 anos, e tem revolucionado muitos aspetos da ciência e tecnologia (Almann *et al.*, 1995; Dorak, 2007). Atualmente, esta técnica continua em evolução e tem provado ser bastante útil no que respeita ao controlo ambiental. No entanto, a tecnologia PCR é ainda cara, cerca de 15 mil euros pelo equipamento, fora o custo associado aos consumíveis necessários para a detecção de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. Além de que esta técnica não elimina a confirmação dos resultados positivos, pelo na presença de uma colónia suspeita é necessário efetuar os testes de confirmação.

O Mini-Vidas® é um equipamento mundialmente apreciado pela sua simplicidade, flexibilidade e precisão. É líder na detecção patogénica de origem alimentar (incluindo *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157:H7, enterotoxinas de *Staphylococcus*). Trata-se de um instrumento multi-paramétrico usando a tecnologia enzyme linked fluorescente assay (ELFA), é baseado no conceito de amostra simples pronto a usar (<http://www.biomerieux.pt>). Embora seja um instrumento ligeiramente mais acessível que o termociclador usado no PCR, este ronda um investimento inicial de cerca de 12 mil euros, além do custo associado aos consumíveis necessários para a detecção dos diferentes patogénicos. Trata-se, também, de uma técnica que não elimina a confirmação dos resultados positivos, pelo que na presença de um valor igual ou superior a 0,25 ou 0,5 (*Salmonella* e *Listeria monocytogenes*, respetivamente), deve-se repicar uma alíquota de amostra da solução-mãe, para um meio seletivo (e.g. Chromo*Salmonella* ou Ottaviani Agostini Agar, detecção de *Salmonella* spp, ou *Listeria monocytogenes*, respetivamente), e proceder à respetiva incubação por um período de 24 h a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . No caso da pesquisa de *Salmonella* spp., deve efectuar-se a confirmação bioquímica através do API 20E (Biomerieux, França) e confirmar a presença da bactéria com testes serológicos. Na pesquisa de *Listeria monocytogenes* basta analisar-se as placas

do meio de cultura seletivo e verificar a presença de colónias típicas (colónias de coloração azul esverdeada rodeadas por um halo opaco).

## **1.6. Análise por Espectroscopia de Infravermelho**

Analisando-se os métodos atualmente disponíveis no mercado e a taxa de incidência destes dois microrganismos (ocorrem 99 casos de salmonelose e 1 a 6 casos de listeriose por cada 100.000 habitantes) (EFSA, 2012) verifica-se a necessidade de desenvolver um método célere e mais acessível, que liberte os laboratórios de confirmações extremamente dispendiosas, como são os testes de confirmação bioquímica e serológicos. Por este motivo, é pertinente testar as potencialidades da espectroscopia de infravermelho na análise de *Listeria* e *Salmonella* em alimentos.

A espectroscopia de infravermelho (MIR) tem sido usada desde a década de 1980 como um método complementar para diferenciação de bactérias, pois o espectro de absorvância das mesmas no infravermelho representa um “fingerprint” que é característico de uma substância química ou biológica (Oust *et al.*, 2004; Preisner *et al.*, 2006). Esta técnica apresenta diversas vantagens no campo da classificação e identificação microbiológica: é um método muito rápido (praticamente não exige manipulação da amostra e permite obter espectros em apenas alguns segundos), não destrutivo, pode ser estudada qualquer amostra em qualquer estado, pode ser usado com diferentes finalidades (como por exemplo, deteção, enumeração, classificação e identificação) e permite a diferenciação de níveis taxonómicos (serotipo, estirpe, espécie ou género) (Preisner *et al.*, 2006; Moreirinha, 2009).

No campo da microbiologia, um espectro de MIR de uma célula reflete a sua composição bioquímica (e.g. proteínas, lípidos, DNA/RNA e hidratos de carbono). Duas amostras com espectros de infravermelho idênticos representam o mesmo composto (Cordella *et al.* 2002). A sua elevada sensibilidade e precisão, permite a identificação de microrganismos, mesmo que estes se encontrem no alimento em níveis muito baixos (Ngo-Thi *et al.*, 2003).

A MIR já demonstrou ser um método bastante vantajoso no que se refere a estudos de controlo qualidade alimentar, composição de vários alimentos ou adulterações dos mesmos. O MIR permite atualmente, deteção e distinção das células microbianas na superfície de alimentos (Irudayaraj *et al.*, 2002), bem como a classificação de bactérias de diferentes níveis taxonómicos sem que haja necessidade de uma pré-seleção de estirpes (Helm *et al.*, 1990). No controlo de qualidade alimentar, uma deteção rápida e fidedigna de microrganismos patogénicos é uma tarefa crucial, visto que quanto mais atempadamente se confirmar a presença de microrganismos patogénicos, mais rapidamente se controlam infeções associadas ao consumo de alimentos contaminados (Preisner *et al.*, 2006; Wenning *et al.*, 2013).

Trata-se de um método pouco dispendioso (cerca de 22 mil euros), visto o custo associado ser apenas o investimento inicial de aquisição do equipamento.

## **1.7. Análise Multivariada (PCA)**

Os dados que se obtêm da espectroscopia de infravermelho são dados muito complexos, pelo que a informação obtida dos espectros deve ser analisada com recurso a análise multivariada (Hair *et al.*, 1998, Moreirinha, 2009). Na análise multivariada nem sempre se usam os dados na sua forma original, os espectros são frequentemente transformados antes de se efetuar a análise multivariada, por forma a se diminuir a interferência de factores externos, tais como a quantidade de água existente no ar (Brereton, 2003; Moreirinha, 2009).

A análise de componentes principais (PCA) é uma técnica estatística multivariada que consiste em transformar um conjunto de variáveis originais em outro conjunto de variáveis da mesma dimensão denominadas de componentes principais (Varela, 2008). Trata-se de um método simples e não paramétrico que permite identificar padrões em dados, conseguindo destacar as semelhanças e diferenças entre as amostras analisadas (Moreirinha, 2009). Os componentes principais apresentam propriedades importantes: cada

componente principal é uma combinação linear de todas as variáveis originais, são independentes entre si e estimados com o propósito de reter, em ordem de estimação, o máximo de informação, em termos da variação total contida nos dados. A análise de componentes principais é associada à ideia de redução de massa de dados, com menor perda de informação possível (Varela, 2008).

O relacionamento dos diagramas das coordenadas juntamente com a análise dos mapas das contribuições fatoriais permite estudar os componentes das amostras com as variáveis que têm maior importância em cada componente principal. São desprezadas algumas dimensões que podem apenas conter variabilidade proveniente de ruído ou não informativa (Jolliffe, 1986; Moreirinha, 2009).

## **2. A Labinter**

Este trabalho foi maioritariamente desenvolvido numa entidade privada denominada Labinter – Laboratório Alimentar, Lda, que se encontra sediado na Covilhã.

Apostando claramente na qualidade, a Labinter, adoptou os requisitos da norma NP EN ISO/IEC 17025 e da NP EN ISO 9001. A Labinter é atualmente um Laboratório Acreditado para as matrizes de águas de consumo humano, alimentos e agro-alimentares e colheita de amostras de águas de consumo humano para os parâmetros microbiológicos constantes no anexo técnico (L0562) (Tabela 3), concedido pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC).

Todas as empresas do sector alimentar devem proceder à realização de análises laboratoriais regulares que comprovem o respeito dos critérios microbiológicos estabelecidos, dando orientações quanto à aceitabilidade dos géneros alimentícios e dos seus processos de fabrico, manuseamento e distribuição.



Devem definir procedimentos de amostragem e análise microbiológica de grupos de alimentos, bem como a indicação da utilização de critérios microbiológicos na verificação e validação de processos do sistema HACCP e de outras medidas de higiene vinculadas pelo Regulamento (CE) n.º 852/2004, dando cumprimento ao Regulamento (CE) n.º 2073/2005 de 15 de Novembro de 2005 (relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, alterado pelo Regulamento (CE) n.º 1441/2007 de 5 de Dezembro de 2007).

A Labinter realiza uma vasta gama de análises laboratoriais (Tabela 4) para controlo da qualidade dos produtos alimentares e controlo higiénico dos processos nos mais variados setores de atividade:

- Análises microbiológicas e físico-químicas de águas;
- Análises microbiológicas e físico-químicas de alimentos: carnes e derivados, leite e derivados, pastelaria, pescado, pré-cozinhados, conservas, etc.
- Controlo higio-sanitário das superfícies, utensílios, equipamentos, mãos manipuladores.

Possui ainda técnicos certificados pela Relacre (Associação de Laboratório Acreditados de Portugal) para a realização de colheita de amostras de águas de consumo humano. Trata-se, também, de um laboratório referenciado pelo ERSAR (Entidade Reguladora dos Serviços de Água e Resíduos), para controlo da qualidade da água para consumo humano.

As análises são realizadas em conformidade com as normas em vigor (nacionais e/ou internacionais): Normas Portuguesas (NP) do Instituto Português da Qualidade, Normas Europeias do “European Committee for Standardization” (EN) e Normas Internacionais do “International Organization for Standardization” (ISO). A seleção dos métodos de ensaio utilizados, incluindo métodos de amostragem, deve satisfazer, as necessidades do cliente e serem apropriados para os ensaios que realiza, sendo este mantido informado dos métodos selecionados. A Labinter deve garantir que utiliza a edição em vigor de cada norma, a menos que não seja adequado ou possível fazê-lo. Quando necessário, a norma deve ser complementada com pormenores adicionais de forma a garantir uma aplicação consistente.

A Labinter participa, ainda, em ensaios interlaboratoriais de águas e alimentos, organizados pelo HPE (Public Health England) em parceria com o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, I.P., de forma a garantir a qualidade do seu sistema de qualidade.

**Tabela 3** – Ensaios realizados incluídos no âmbito da acreditação (L0562)

Produto	Ensaio	Método
<b>Águas</b>		
<b>Água de Consumo</b>	Colheita de amostras para os ensaios microbiológicos constantes deste anexo técnico	ISO 19458:2006
	Contagem de Microrganismos a 22°C	ISO 6222:1999
	Incorporação	
	Contagem de Microrganismos a 37°C	ISO 6222:1999
	Incorporação	
	Pesquisa e quantificação de Bactérias coliformes	MI 001 V.1.2 (2012-04-18)
	Método de filtração por membrana	
	Pesquisa e Quantificação de <i>Clostridium perfringens</i>	EA Parte 6 Método B
	Método de filtração por membrana	The Microbiology of Drinking Water (2010)
	Pesquisa e quantificação de <i>E.coli</i>	MI 001 V.1.2 (2012-04-18)
	Método de filtração por membrana	
	Pesquisa e quantificação de <i>Enterococcus</i>	ISO 7899-2:2000
<b>Alimentos e Agro-Alimentar</b>		
<b>Produtos Alimentares</b>	Contagem de microrganismos a 30°C	ISO 4833:2003
	Contagem <i>E.coli</i>	ISO 16649-2:2001
	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp	ISO 6579:2002

**Tabela 4** – Ensaio realizados não incluídos no âmbito da acreditação.

Produto	Ensaio	Método
<b>Produtos Alimentares</b>	Contagem de Bactérias Coliformes a 30°C	ISO 4832:2006
	Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	ISO 21528-2:2004
	Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva	ISO 6888-1/2:1999
	Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-1:1996 (Amd:2004)
	Contagem de <i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-2:1998 (Amd:2004)
	Contagem de <i>Clostridium perfringens</i>	ISO 7937:2004
	Contagem de Bolores e Leveduras	ISO 21527-1:2008
	Pesquisa de Esporos de clostrídios sulfito-redutores	NP 2262:1986
<b>Zaragatoas</b>	Contagem de <i>Bacillus cereus</i>	ISO 7932:2004
	Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 18593:2004, ponto 8 e 9; ISO 11290-1:1996 (Amd:2004)
	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	ISO 18593:2004, ponto 8 e 9; ISO 6579:2002
	Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva	ISO 18593:2004, ponto 8 e 9; ISO 6888-1/2:1999
	Contagem de Microrganismos a 30°C	ISO 18593:2004, ponto 8 e 9; ISO 4833:2003
<b>Zaragatoas / Placas de Contacto / Ar Ambiente</b>	Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	ISO 18593:2004, ponto 8 e 9; ISO 21528-2:2004
	Contagem de Bolores e Leveduras	ISO 18593:2004, ponto 8 e 9; ISO 21527-1:2008
<b>Superfícies de Carcaças</b>	Contagem de Microrganismos 30°C	ISO 17604:2003, Anexo B; ISO 4833:2003
	Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	ISO 17604:2003, Anexo B; ISO 21528-2:2004
	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	ISO 17604:2003, Anexo B; RAPID <sup>®</sup> Salmonella
		ISO 17604:2003, Anexo B; ISO 6579:2002
<b>Águas de Consumo</b>	Pesquisa e Quantificação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ISO 16266:2006
	Pesquisa e Quantificação de <i>Staphylococcus</i>	NP 4343:1998
	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	ISO 19250:2010

### **3. Métodos Normalizados**

#### **3.1. Pesquisa de *Salmonella* spp. – ISO 6579:2002**

De uma maneira geral, a pesquisa de *Salmonella* é feita em quatro fases:

##### **a) Pré-enriquecimento**

Para a preparação da suspensão-mãe utiliza-se como diluente o meio de pré-enriquecimento, água peptonada tamponada (APT). Na preparação da suspensão-mãe adiciona-se x g ou x mL da amostra a 9x mL ou 9x g do meio de pré-enriquecimento, desta maneira teremos uma diluição de 1/10 (conforme norma ISO 6887-1). A amostra é incubada a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  por um período de  $18 \pm 2\text{h}$ .

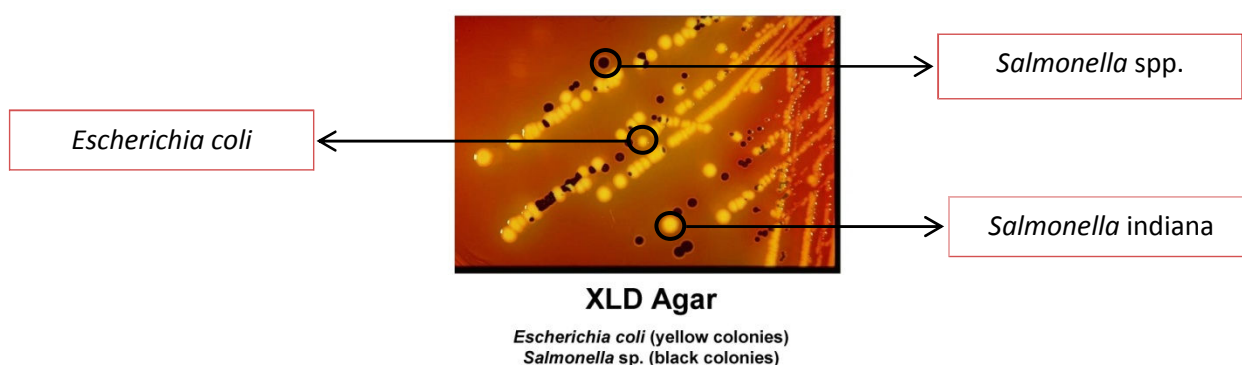
##### **b) Enriquecimento Seletivo**

Transfere-se 0,1 mL da cultura obtida no pré-enriquecimento para um tubo contendo 10 mL de meio de enriquecimento Rappaport-Vassiliadis medium with soya (RVS) e 1 mL da cultura de pré-enriquecimento para meio de enriquecimento Muller-Kauffmann tetrathionate novobiocin (MKTTn). O tubo de RVS é incubado a  $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$  por um período de  $24 \pm 3\text{h}$ , não podendo ser excedida a temperatura de incubação de  $42,5^\circ\text{C}$ . O tubo de MKTTn é incubado a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 3\text{h}$ .

##### **c) Isolamento e Identificação**

Após incubação repica-se o inóculo do meio RVS com uma ansa estéril para duas placas de petri com os meios seletivos – xylose lysine deoxycholate agar (XLD), verde brilhante agar (VBA) ou Chromo *Salmonella* – desta maneira seleccionam-se as espécies que se pretendem isolar e impede-se o desenvolvimento de outras. Procede-se de igual modo para o inóculo proveniente do meio MKTTn, ou seja, repica-se o inóculo e efectua-se o riscado

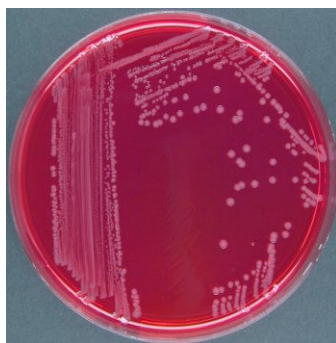
em duas placas de petri com os meios seletivos (XLD e/ou VBA e/ou Chromo *Salmonella*). As placas de XLD e VBA ou Chromo*Salmonella* são incubadas a 37°C durante 24 ± 3h. Após incubação, examinam-se as placas e analisam-se as colónias típicas de *Salmonella* spp. e colónias atípicas que possam ser *Salmonella* spp.. Marcam-se as colónias no fundo da placa. As colónias típicas de *Salmonella* spp. que crescem no meio XLD apresentam uma coloração negra no centro e uma ligeira coloração avermelhada (Figura 1). As colónias típicas de *Salmonella* spp. que crescem no meio VBA apresentam uma coloração branca a vermelha rodeadas por zonas vermelha (Figura 3). As colónias típicas de *Salmonella* spp. que crescem no meio Chromo*Salmonella* apresentam uma coloração lilás (Figura 2). Existem, no entanto, outro tipo de variantes de *Salmonella* spp., como as estirpes de H<sub>2</sub>S negativas (e.g. *Salmonella* paratyphi A) que crescem em XLD agar com uma coloração rosa e no centro uma coloração rosa mais escuro. As estirpes de *Salmonella* lactose-positiva crescem em XLD agar com uma coloração amarela (Figura 1) com ou sem coloração negra.



**Figura 1** – Colónias típicas de *Salmonella* spp., em meio seletivo XLD agar (<http://microtradeuk.com/products.php>).



**Figura 2** – Colónias típicas de *Salmonella* spp., em meio seletivo Chromo*Salmonella* ([www.biogerm.pt](http://www.biogerm.pt)).

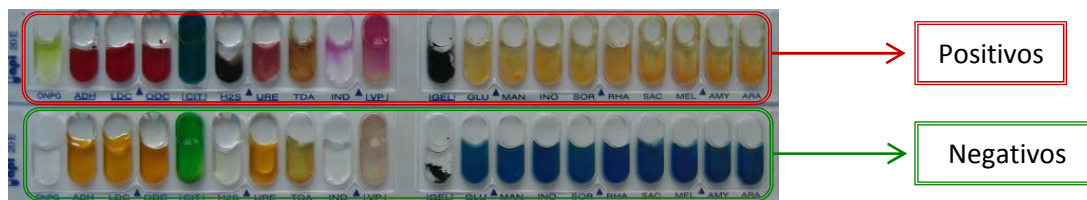


**Figura 3** – Colónias típicas de *Salmonella* spp., em meio seletivo Verde Brillante Agar ([http://pictures.life.ku.dk/atlas/microatlas/veterinary/plating\\_media/BPLS/](http://pictures.life.ku.dk/atlas/microatlas/veterinary/plating_media/BPLS/) ).

#### **d) Confirmação Bioquímica**

Para a confirmação de *Salmonella* deve ser repicada da placa de petri (meio de cultura XLD, VBA ou Chromo*Salmonella*) um colónia típica ou suspeita. Caso o resultado seja negativo para *Salmonella* spp., devem ser repicadas mais 4 colónias típicas ou suspeitas. Em caso de estudos epidemiológicos, devem ser identificadas pelo menos 5 colónias típicas ou suspeitas. Na ausência de 5 colónias típicas ou suspeitas, devem ser identificadas todas as colónias existentes nas placas. Podem-se usar kits de identificação bioquímica (e.g. API 20 E (Biomérieux, França)) de estirpes de *Salmonella* spp. (Figura 4 e 5). Estes kits confirmam bioquimicamente as colónias características. As instruções do fabricante devem ser seguidas à risca.

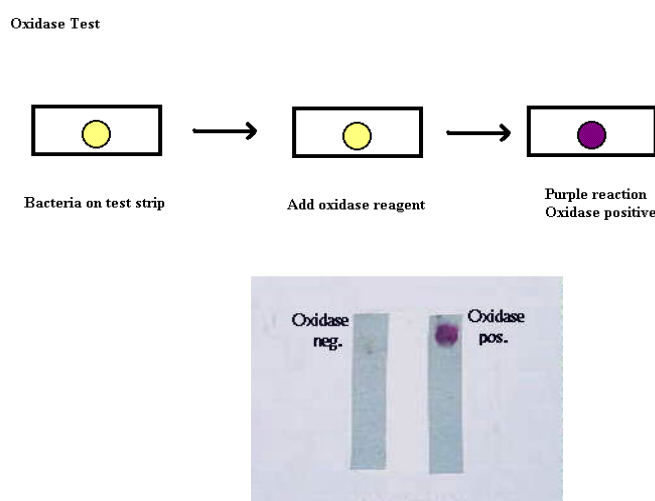
O teste oxidase deve ser efetuado de acordo com as instruções do fabricante e constitui o 21º teste de identificação bioquímica do API 20E (Figura 6).



**Figura 4 –** Leitura API 20 E da Biomerieux ([www.tgw1916.net/Tests/api.html](http://www.tgw1916.net/Tests/api.html)).



**Figura 5** – Galeria de *Salmonella* spp. em galeria API 20E da Biomerieux (<http://en.convdocs.org/docs/index-52279.html>).



**Figura 6 – Teste de confirmação – Oxidase**

([www.uaz.edu.mx/histo/pathology/ed/ch\\_9b/path/oxidase.htm](http://www.uaz.edu.mx/histo/pathology/ed/ch_9b/path/oxidase.htm) e <http://loudoun.nvcc.edu>).

Para finalizar efetua-se o teste OMNIO (e.g. Bio-Rad, Estados Unidos), que é um teste imunológico de aglutinação. Neste teste é usado anti-soro *Salmonella* omnivalent. As estirpes de *Salmonella* spp. sofrem aglutinação (Figura 7).



**Figura 7** – Confirmação serológica de *Salmonella* spp ([www.pvl.pt](http://www.pvl.pt)).

### 3.2. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* – ISO 11290-1:1996

De uma maneira geral, para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* são necessárias várias fases:

#### a) Enriquecimento Primário

Nesta fase utiliza-se o meio seletivo primário Half-Fraser. Na preparação da suspensão-mãe deve-se adicionar x g ou x mL da amostra a 9x mL ou 9x g do meio half-fraser, desta maneira teremos uma diluição de 1/10 (volume por massa ou volume por volume) (conforme norma ISO 6887-1). A suspensão primária é incubada a 30°C durante  $24 \pm 2$  h (Ver nota 1).

#### b) Enriquecimento Secundário

Findo o tempo de incubação da suspensão no meio de enriquecimento primário, transfere-se 0,1 mL da cultura obtida (independentemente da cor) para um tubo de meio de enriquecimento secundário (Fraser broth) . O meio é incubado durante  $48 \pm 2$  h a 35°C ou 37°C (Ver nota 2).



### c) Isolamento e Identificação

Da cultura obtida com o meio de enriquecimento primário (placas incubadas a  $24 \pm 2$  h a  $30^{\circ}\text{C}$  em half-fraser broth), retira-se com uma ansa esterilizada uma pequena porção e inocula-se na superfície de uma placa de petri previamente preparada com o meio OCLA (agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti), de forma a obterem-se colónias bem definidas (*Ver* nota 3). Procede-se de igual modo para o segundo meio seletivo, Palcam (*Ver* nota 3). Da cultura obtida no meio de enriquecimento secundário (incubadas a  $48 \pm 2$  h a  $35^{\circ}\text{C}$  ou  $37^{\circ}\text{C}$  em meio Fraser Broth), retira-se uma pequena porção e inocula-se do mesmo modo os meios OCLA e Palcam. As placas de OCLA são incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  e as placas de Palcam a  $30^{\circ}\text{C}$ ,  $35^{\circ}\text{C}$  ou  $37^{\circ}\text{C}$ . As placas de Palcam devem ser incubadas em aerobiose. Ao fim de  $24 \pm 3$  h, analisam-se as placas e caso se verifique um fraco ou inexistente crescimento de colónias o tempo de incubação é prolongado por mais  $24 \pm 3$  h. Após este tempo, analisam-se todas as placas e verifica-se a presença de *Listeria* spp.. No meio OCLA as colónias típicas de *Listeria monocytogenes* apresentam uma coloração azul esverdeada rodeadas por um halo opaco (Figura 8).



**Figura 8** – Colónias típicas de *Listeria monocytogenes* em meio seletivo OCLA ([www.oxoid.com](http://www.oxoid.com)).

No meio Palcam as colónias típicas de *Listeria* spp., após incubação de 24 h, são colónias pequenas ou muito pequenas de cor verde azeitona ou acinzentadas, medem aproximadamente 1,5 – 2mm de diâmetro, às vezes com centros negros mas possuem sempre halos pretos. No meio Palcam, após 48 de incubação, as colónias de *Listeria* spp.

aparecem com uma coloração verde com um diâmetro de 1 – 2 mm, com uma depressão central e rodeadas por um halo negro (Figura 9).



**Figura 9** – Colónias típicas de *Listeria* spp. em meio seletivo Palcam ([http://foodmicrobiologee.blogspot.pt/2012\\_08\\_01\\_archive.html](http://foodmicrobiologee.blogspot.pt/2012_08_01_archive.html)).

Nota 1 – Poderá haver desenvolvimento de uma coloração negra.

Nota 2 – A temperatura do meio inoculado deve estar em concordância e registada no boletim de análise.

Nota 3 – Executa-se este procedimento independentemente da coloração do meio.

#### **d) Confirmação de *Listeria* spp.:**

##### **Seleção de Colónias para Confirmação:**

Para confirmação, escolhem-se de cada meio seletivo, pelo menos 5 colónias presuntivas para *Listeria* spp. Caso uma das placas tenha menos do que 5 colónias, retiram-se todas para confirmação. Faz-se um riscado em meio tryptone soya yeast extract agar (TSYEA) de forma a obter colónias bem isoladas. As placas são incubadas a 35°C ou 37°C por um período de 18h a 24h. As colónias típicas apresentam diâmetro de 1 – 2mm, são convexas e incolores com um halo opaco. No caso de não se obterem colónias bem isoladas deve-se repicar novamente uma colónia característica para outra placa de TSYEA. São então feitos vários testes de confirmação a partir de uma cultura pura obtida através do meio TSYEA.

### Reação da Catalase:

Retirar uma colônia isolada obtida através da cultura em meio TSYEA e, sobre uma lâmina, suspende-la numa gota de solução de peróxido de hidrogênio. Se houver formação imediata de bolhas de gás é indicação de uma reação positiva.

### e) Confirmação de *Listeria monocytogenes*:

#### Teste da Hemólise:

Se as características morfológicas e fisiológicas, juntamente com a reação da catalase nos indicarem a presença de uma *Listeria* spp., deve-se fazer o teste da hemólise. Para tal faz-se um riscado em agar Columbia 5% . As placas são incubadas a 35°C ou 37°C por um período de 24 ± 2h. Após incubação as placas são examinadas e verifica-se se há reação hemolítica:

- *Listeria monocytogenes*, possui zonas claras e estreitas ( $\beta$ -hemólise) (Figura 10);
- *Listeria innocua* não possui nenhuma zona clara em redor do riscado;
- *Listeria seeligeri* possui uma zona muito fraca de hemólise;
- *Listeria ivanovii* possui uma ampla zona bem delimitada de  $\beta$ -hemólise.



**Figura 10** – Meio Agar Columbia 5% - Existência de Hemólise (<http://ccgb.fiocruz.br/index?services>).

## Testes Bioquímicos:

Nesta situação podem-se usar Kits de identificação bioquímica de estirpes de *Listeria* spp.. Estes kits dão-nos a confirmação bioquímica de colónias características e devem ser seguidas à risca as instruções do fabricante (API *Listeria* (Biomerieux, França) ou RAPIDEC *L.mono* (Biomerieux, França)) (Figura 11, 12 e 13).



**Figura 11** – Leitura API *Listeria*

([www.bbcorp.co.kr/index.php?mm\\_code=112&sm\\_code=121](http://www.bbcorp.co.kr/index.php?mm_code=112&sm_code=121))



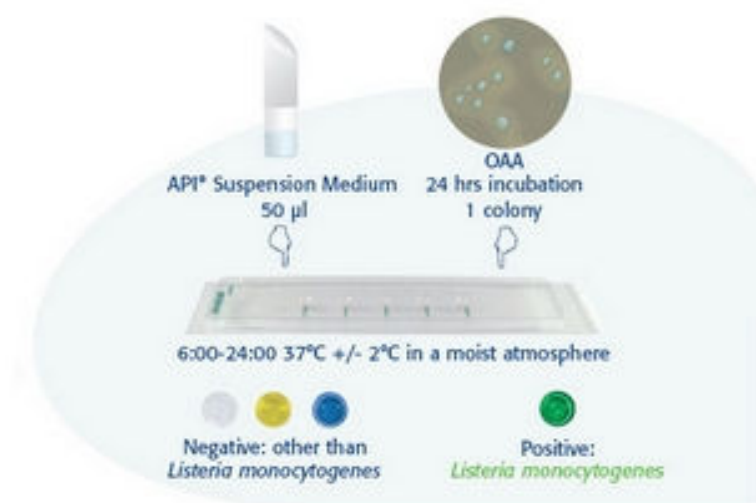
**Figura 12** - Galeria de *Listeria monocytogenes* em galeria API *Listeria*

([www.microbes-edu.org/professionel/diag/listeria.html](http://www.microbes-edu.org/professionel/diag/listeria.html)).

O RAPIDEC *L.mono*, é uma técnica de confirmação bioquímica inovadora e bastante eficiente, pois este teste deteta a actividade enzimática de duas enzimas:

- Actividade de fosfatidilinositol fosfolipasa C (PIPLC) – cor azul
- Actividade de  $\alpha$ -manosidase ( $\alpha$ -MAN) – cor amarela

Quando a atividade é positiva para as duas enzimas as colónias de *Listeria monocytogenes* apresentam uma coloração verde característica (Figura 13).



**Figura 13** – RAPIDEC *L.mono* ([www.biomerieux-industry.com](http://www.biomerieux-industry.com)).

## 4. Objectivos

O objetivo deste trabalho foi testar o potencial da espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier como método rápido para avaliar a presença/ausência de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, em amostras de matrizes alimentares (e.g. pratos confeccionados, queijos e enchidos).

Os objetivos específicos foram:

- Detetar a presença de bactérias *Salmonella* spp., provenientes do meio de cultura XLD.
- Detetar a presença de bactérias *Listeria monocytogenes*, provenientes do meio de cultura OCLA e distinguir diferentes espécies.
- Distinguir *Salmonella* spp. de outras bactérias que também crescem em meio de cultura XLD (e.g. *Citrobacter*, *Proteus*, *Shigella*).

## **5. Material e Métodos**

### **5.1. Preparação das Amostras**

A Labinter efetua as análises tendo como base as normas internacionais (ISO) em vigor, tal como se encontra descrito no ponto 3.1. (ISO 6579:2002) e 3.2. (ISO 11290-1:1996), sendo todos os meios de cultura utilizados fornecidos pela Biogerm, Portugal.

#### **5.1.1. Pesquisa de *Salmonella* spp.**

Na preparação da suspensão-mãe pesaram-se 25 g ou 10 g do produto alimentar (e.g. prato confeccionado, queijo e enchidos) e adicionou-se 225 g ou 90 g do meio de pré-enriquecimento, APT, respetivamente. A quantidade de amostra a pesar, teve como base a legislação europeia e/ou portuguesa em vigor (e.g. Regulamento (CE) 1441/2207 de 5 Dezembro).

Depois de inoculada a amostra à temperatura ambiente, colocou-se na estufa à temperatura de  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante  $18 \pm 2$  h. O meio de pré-enriquecimento APT foi mantido à temperatura ambiente, nunca foi refrigerado de forma a não inibir o desenvolvimento das bactérias em análise. Transferiu-se 0,1 mL da cultura obtida no pré-enriquecimento para um tubo de meio RVS e 1 mL para um tubo de MKTTn. O tubo contendo o meio RVS foi incubado a  $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ , e o tubo contendo o meio MKTTn a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 3$  h.

Findo o tempo de incubação, repicou-se uma alíquota do meio RVS e procedeu-se ao riscado em duas placas de petri com os meios seletivos. No caso das amostras de enchidos e queijos, os meios seletivos utilizados foram o XLD e *ChromoSalmonella*. Para as amostras de pratos confeccionados, os meios seletivos utilizados foram o XLD e VBA. Quando se procedeu ao riscado utilizou-se a mesma ansa de forma a obter-se colónias bem isoladas. Procedeu-se de igual modo para o inóculo proveniente do meio MKTTn. As placas de meios seletivos foram incubadas  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  por um período de  $24 \pm 3$  h.

Analysaram-se as placas e verificou-se a existência de colónias típicas ou suspeitas de *Salmonella* spp. (Figuras 1 e 2). Repicaram (sempre que existente) 5 colónias típicas ou suspeitas para o meio tryptic soy agar (TSA), meio gelosado não seletivo, de forma a obter-se colónias mais puras. As placas de TSA foram incubadas a  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24 \pm 3\text{h}$ .

A confirmação das colónias foi efetuada através do kit de identificação API 20E (Biomérieux, França). O API 20E engloba 21 mini-testes bioquímicos e uma base de dados (APIweb).

O teste da oxidase foi efetuado de acordo com as instruções do fabricante (Biogerm, Portugal) e constitui o 21 teste de identificação.

Repicou-se uma colónia bem isolada no meio TSA, para um tubo contendo uma solução de NaCl 0,85% (5 mL) (Biomérieux, França), e procedeu-se à inoculação da galeria, conforme indicação do fabricante (Figura 5).

Sempre que o perfil numérico deu fraca discriminação, repicaram-se mais 4 colónias típicas ou suspeitas para o meio TSA, e efectuaram-se novamente os ensaios tal como descrito anteriormente.

### **5.1.2. Pesquisa de *Listeria monocytogenes***

Na preparação da suspensão-mãe pesaram-se 25 g ou 10 g do produto alimentar (e.g. prato confeccionado, queijo e enchidos) e adicionou-se 225 g ou 90 g do meio de pré-enriquecimento, semi-fraser, respetivamente. A quantidade de amostra a pesar, teve como base a legislação europeia e/ou portuguesa em vigor (e.g. Regulamento (CE) 1441/2207 de 5 Dezembro).



Depois de inoculada a amostra à temperatura ambiente, colocou-se a 30°C durante  $24 \pm 2$  h. Os meios de cultura foram armazenados à temperatura ambiente, nunca refrigerados, de forma a evitar a inibição do desenvolvimento das bactérias em análise.

Após incubação da suspensão inicial, transferiu-se 0,1 mL da cultura obtida (independentemente da cor) para um tubo de enriquecimento secundário, meio fraser, que foi incubado a 37°C por um período de  $48 \pm 2$  h.

Da suspensão-mãe (enriquecimento primário) e do enriquecimento secundário, retirou-se com uma pequena porção e inoculou-se uma placa de OCLA, por forma a se obterem colónias bem definidas. Procedeu-se de igual modo para o segundo meio seletivo, Palcam. Ambos os meios foram incubados na estufa a 37°C durante  $24 \pm 3$  h. As placas foram examinadas, na ausência de colónias ou na presença de um fraco crescimento foram re-incubadas a 37°C durante  $24 \pm 3$  h.

Foram consideradas colónias típicas ou suspeitas de *Listeria monocytogenes*:

- no meio OCLA com uma coloração azul esverdeada rodeadas por um halo opaco (Figura 8);
- no meio Palcam com uma coloração verde com um diâmetro de 1 – 2mm, com uma depressão central e rodeadas por um halo negro (Figura 9).

Sempre que as colónias apresentaram características morfológicas e fisiológicas de *Listeria monocytogenes*, procedeu-se ao teste da hemólise. Para tal, secou-se previamente uma placa de colúmbia 5% s. cavalo ou colúmbia 5% s. carneiro. De seguida repicou-se uma colónia bem isolada do meio OCLA ou Palcam e procedeu-se ao riscado no meio colúmbia 5%, que foi incubado a 37°C por um período de  $24 \pm 2$ h. Após incubação, examinaram-se as placas e verificou-se se havia reação hemolítica. Na presença de *Listeria monocytogenes* o meio colúmbia 5% apresenta zonas claras e estreitas (Figura 10).

Foi usado o teste de confirmação bioquímica RAPIDEC *L.mono*. Este teste só funciona para colónias isoladas provenientes do meio de cultura OCLA. Desta forma, e sempre que

a reação hemolítica foi positiva, procedeu-se à inoculação da galeria tal como indicado pelo fornecedor:

- foi colocado em cada poço a utilizar, 50 µL de uma solução salina (Biomérieux, França);
- repicou-se uma colónia isolada do meio OCLA e inoculou-se o poço contendo a solução salina;
- Colocou-se a galeria em atmosfera húmida a 37°C entre 6 a 24 h;
- Ao fim do tempo de incubação verificou-se a coloração da galeria, cor verde indica a presença de *Listeria monocytogenes* (Figura 13).

## 5.2. Recolha de Estirpes

Os isolados de *Salmonella* spp. (5 isolados) e *Listeria monocytogenes* (2 isolados) foram obtidos de amostras positivas e criopreservados em tubos VIBAKSTORE (Frilabo, Portugal) a -70°C. Além destes microrganismos, foram também criopreservados isolados de *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Shigella* spp. (1 isolado de cada estirpe) *Listeria innocua* (2 isolados) e *Listeria ivanovii* (1 isolado).

As estirpes criopreservadas de *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp. e *Shigella* spp. foram isoladas a partir dos meios de cultura, XLD e Chromo*Salmonella*. As estirpes criopreservadas de *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* e *Listeria ivanovii* foram obtidas a partir dos meios de cultura OCLA e Palcam.

### **5.3. Reativação das Estirpes Microbianas**

#### **5.3.1. *Salmonella* spp.**

Na reativação da *Salmonella* spp. usaram-se dois métodos:

- retirou-se uma esfera porosa para um tubo contendo o meio APT (Biogerm, Portugal) e o ensaio foi realizado conforme descrito no ponto 5.1.1.
- retirou-se uma esfera porosa e inoculada directamente no meio de cultura – XLD e Chromo*Salmonella* (ambos da Biogerm, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante dos tubos de criopreservação VIBAKSTORE.

#### **5.3.2. *Citrobacter, Proteus e Shigella***

Na reactivação destas *Enterobacteriaceae*s utilizou-se um único método de reactivação. Retirou-se uma esfera porosa do tubo de criopreservação e inoculou-se directamente no meio de cultura – XLD (Biogerm, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante.

#### **5.3.3. *Listeria monocytogenes***

Na reativação da *Listeria monocytogenes* usaram-se dois métodos:

- retirou-se uma esfera porosa para um tubo contendo o meio semi-fraser (Biogerm, Portugal) e o ensaio realizado conforme descrito no ponto 5.1.2..
- retirou-se uma esfera porosa e inoculada directamente no meio de cultura – OCLA (Biogerm, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante dos tubos de criopreservação VIBAKSTORE.

#### **5.3.4. *Listeria innocua* e *Listeria ivanovii***

Na reactivação da *Listeria innocua* e *ivanovii* utilizou-se um único método de reactivação. Retirou-se uma esfera porosa do tubo de criopreservação e inoculou-se directamente no meio de cultura – OCLA (Biogerm, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante.

#### **5.4. Análise por Espectroscopia de Infravermelho Médio**

A análise espectroscópica das amostras foi efetuada num espectrómetro de infravermelho (FT-IR-ATR, Brucker ALPHA), com uma resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e 32 varrimentos, na região do infravermelho médio (zona entre 4000 e 600 cm<sup>-1</sup>). Foram obtidos 5 espectros de cada isolado a analisar. A amostra foi retirada com um palito esterilizado e colocada directamente no acessório de amostragem do aparelho. A amostra foi seca, com recurso a um secador com a ventilação no frio e com um máximo de 30 segundos de secagem, colocado sempre à mesma distância da amostra (40 cm).

#### **5.5. Análise de Componentes Principais (PCA)**

A análise multivariada dos espectros foi efetuada recorrendo à análise de componentes principais (PCA), utilizando o software CATS build 97 desenvolvido pelo Institut Nationale Recherche Agronomique, Paris e a Universidade de Aveiro (Barros, 1999). A zona espectral escolhida para a análise foi a região entre 1200 a 980 cm<sup>-1</sup>, pois foi a que permitiu obter melhores resultados para as amostras analisadas. Os espectros foram normalizados antes de qualquer análise. Os mapas das coordenadas fatoriais e os diagramas das contribuições fatoriais foram elaborados no Microsoft Excel 2010.

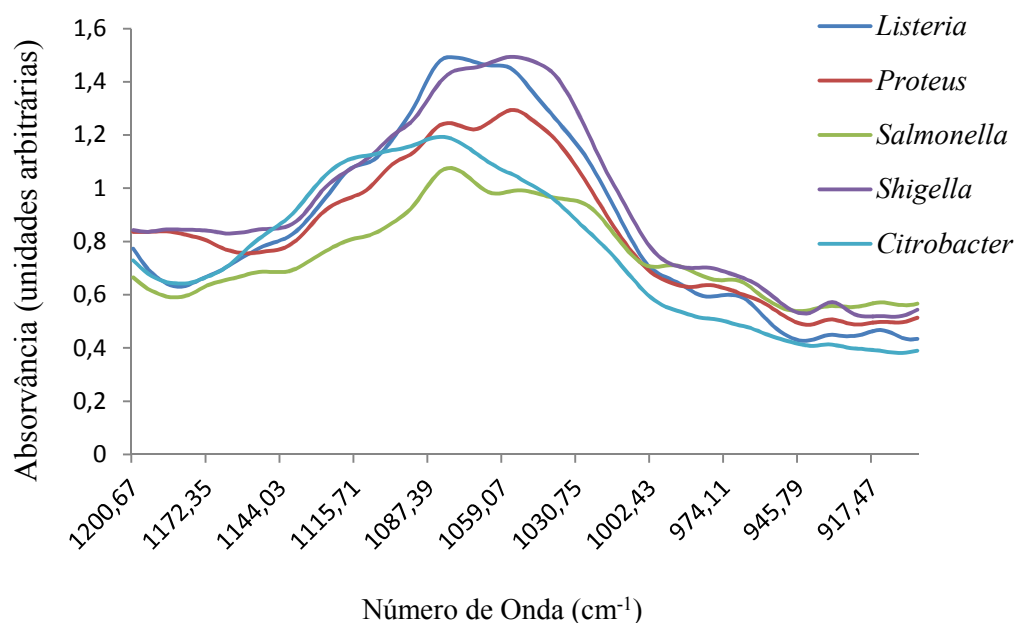
## 6. Resultados e Discussão

Os espectros obtidos no MIR são considerados padrões de “fingerprint” com elevada sensibilidade e reprodutibilidade, característicos das diferentes bactérias (Naumann, 1985). Cada grupo funcional diferente absorve radiação em certas frequências, originando bandas de absorção características (Tabela 5).

**Tabela 5** – Valores de absorção de diferentes grupos funcionais no infravermelho  
(adaptado de Stuart, 2004 e Movasaghi *et al*, 2008)

Número de Onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo Funcional
3640 – 3610	O-H (livre)
3500 – 3070	N-H
2960 – 2850	C-H alifáticos
1750 – 1740	C=O de ésteres (gordura)
1740 – 1720	C=O de aldeídos
1675 – 1645	C=C
≈ 1650	Amida I
1590 – 1550	NH <sub>2</sub>
≈ 1550 e 1517	Amida II
1470 – 1430	CH <sub>2</sub>
1390 – 1370	CH <sub>3</sub>
1420 e 1300 – 1200	C-O de ácidos carboxílicos
1300 – 1020	C-O de ésteres
1250 e 1310 – 1307	Amida III
1200 – 1050	C-O de álcoois e fenóis
1155 – 1150	C-O de hidratos de carbono
1024 – 998	C-OH de hidratos de carbono

Neste estudo, foi evidente a diferença entre os espectros correspondentes a cada uma das bactérias estudadas, principalmente na zona de 1200 – 980 cm<sup>-1</sup> (Figura 14), correspondendo esta zona a vários tipos de ligações C-O, com particular relevância neste caso, em compostos tais como polissacarídeos.

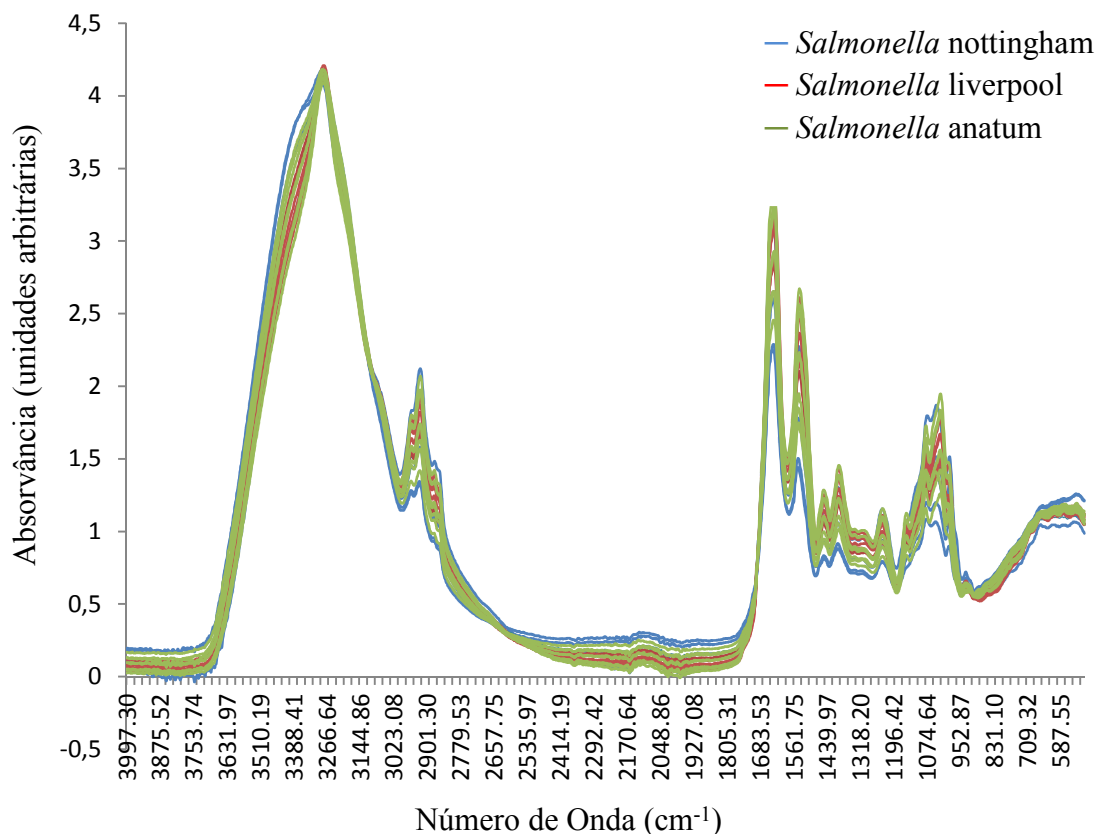


**Figura 14** – Média das réplicas referentes aos espectros de infravermelho de cada bactéria estudada na zona de 1200 – 980  $\text{cm}^{-1}$ .

### 6.1. *Salmonella* spp.

*Salmonella* é um importante agente patogénico na indústria alimentar, sendo atualmente um agente bacteriológico de surtos de origem alimentar (Siqueira *et al.*, 2003). Todos os animais destinados à alimentação são susceptíveis de contaminação por *Salmonella*. A contaminação por *Salmonella* pode ou não levar a uma salmonelose, por vezes fatal, ou a uma doença que pode permanecer localizada no trato gastrointestinal (e.g. gastroenterite), ou tornar-se generalizada como uma septicemia, afetando diferentes órgãos (Ekperigin *et al.*, 1998). No entanto, os métodos tradicionais podem demorar cerca de uma semana, ou mais, até se conseguirem obter resultados conclusivos. Deste modo, torna-se pertinente determinar atempadamente a *Salmonella*, pois quanto mais cedo a mesma for detetada, mais rapidamente se atua na sua erradicação.

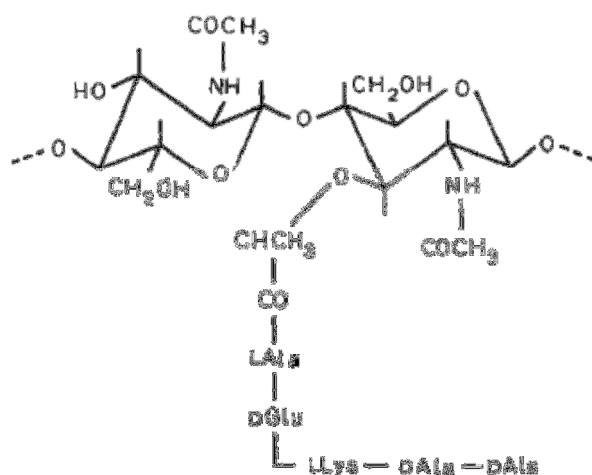
Na figura 15 encontram-se representados os espectros das *Salmonella* estudadas.



**Figura 15** – Espectros de infravermelho de *Salmonella*.

Nesta análise foram incluídos, para além de *Salmonella* spp., colónias de *Proteus*, *Citrobacter* e *Shigella*. As *Enterobacteriaceae* em estudo foram escolhidas devido ao facto de também crescerem no meio seletivo XLD com características semelhantes às colónias de *Salmonella*, o que faz com que seja necessário uma posterior confirmação. Sendo assim, é importante conseguir diferenciar estas colónias de uma forma mais rápida e eficaz.

Na figura 17 encontram-se representados os espectros das diferentes *Enterobacteriaceae*. Neste caso é evidente a diferença entre os espectros correspondentes a cada uma das 4 colónias, principalmente na zona de 900 a 1200  $\text{cm}^{-1}$ . Tal situação deve-se à diferença na composição da membrana das diferentes bactérias, no que diz respeito aos glúcidos. Os picos predominantes nos espectros correspondem às peptidoglicanas da parede celular (Figura 16) (Naumann, *et al.* 1982). O espectro é dominado pelas bandas de amida A, B, I e II centradas em 3290  $\text{cm}^{-1}$ , 3085  $\text{cm}^{-1}$ , 1657  $\text{cm}^{-1}$  e 1555  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente.

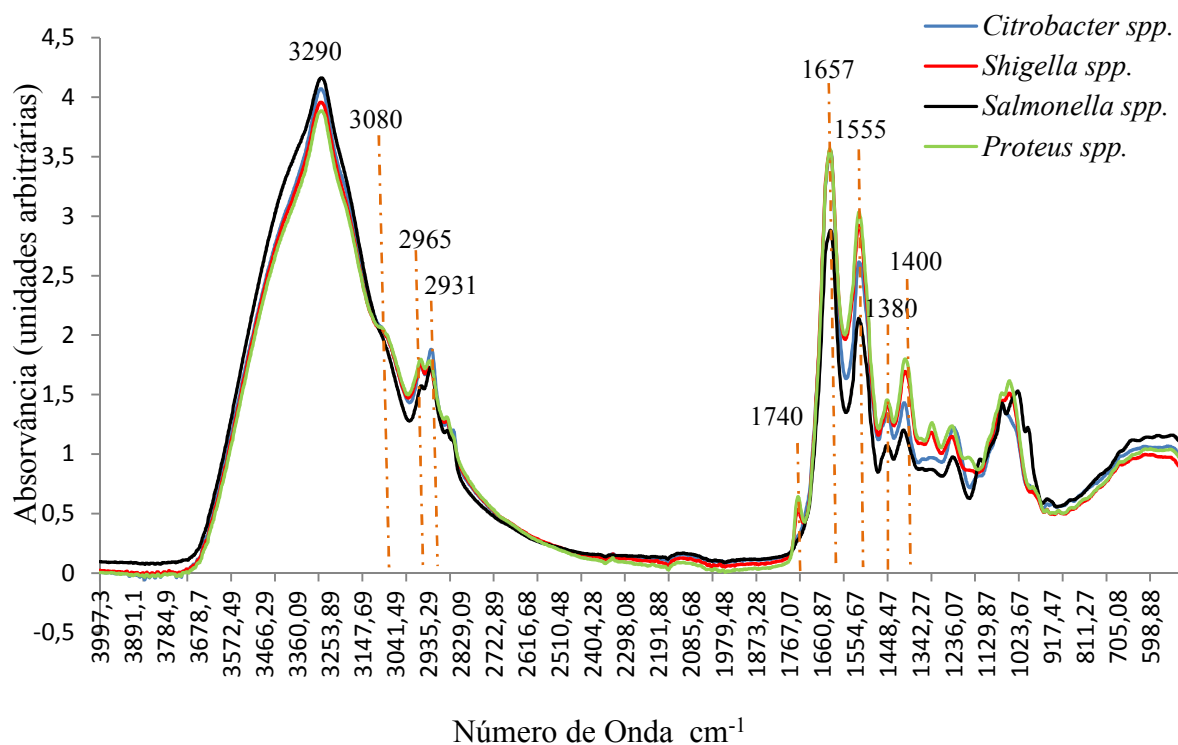


**Figura 16** – Estrutura primária de uma subunidade de peptidoglicana (de Naumann et al. 1982).

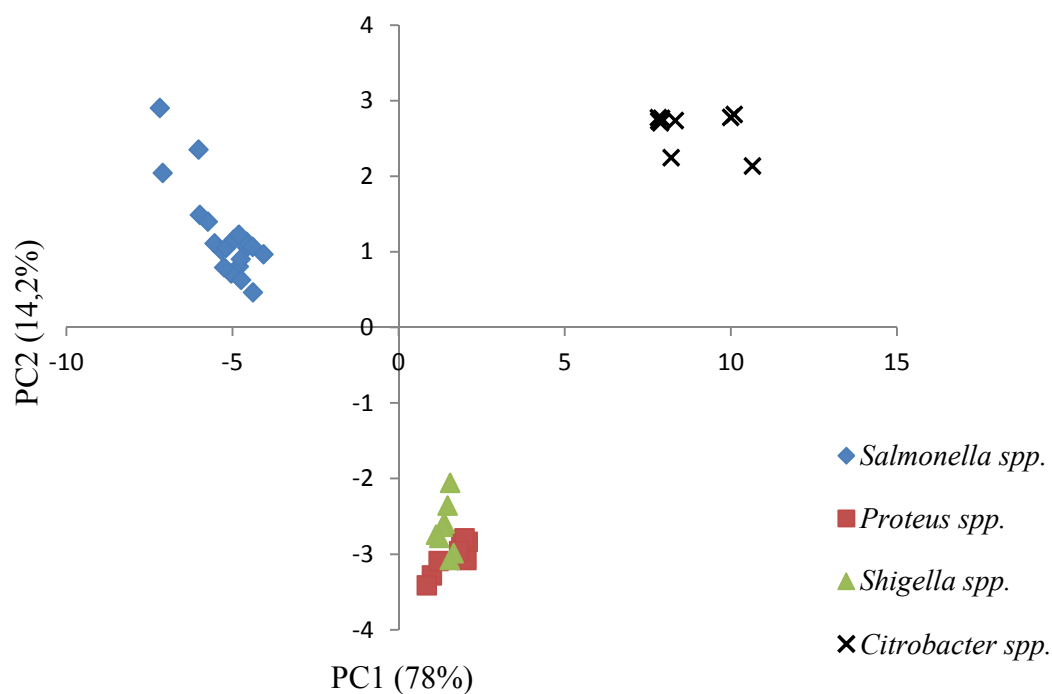
É ainda visível uma grande diferença no espectro da *Salmonella* nos picos de  $2969\text{ cm}^{-1}$  e  $2930\text{ cm}^{-1}$  correspondentes a estiramentos C-H dos grupos  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$  de lípidos e do  $\text{CH}_3$  do acetilo nos grupos amina dos dissacarídeos da peptidoglicana (Movasaghi *et al.*, 2008; Naumann *et al.* 1982). Sendo menos intensos que nas outras 3 bactérias isto pode significar que a parede celular da *Salmonella* tem menos lípidos ou é menos acetilada que a das outras bactérias. É também patente a ausência do pico de  $1740\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao  $\text{C}=\text{O}$  do grupo éster de lípidos na *Salmonella* e no *Citrobacter*, enquanto nas outras *Enterobacteriaceae*s esta banda é evidente. Esta banda pode estar a sobrepor-se a um pico correspondente ao grupo  $\text{C}=\text{O}$  em ácidos carboxílicos protonados que aparece a  $1730\text{ cm}^{-1}$  (Movasaghi *et al.*, 2008; Naumann *et al.* 1982).

Após obtenção dos espectros por MIR e posterior análise multivariada, verifica-se que o diagrama das coordenadas fatoriais (Figura 18) evidencia claramente as diferenças entre as colónias das diferentes espécies estudadas, encontrando-se as colónias de *Salmonella* spp. no quadrante PC1 negativo e PC2 positivo, as colónias de *Citrobacter* spp. no quadrante PC1 e PC2 positivo, enquanto que as colónias de *Shigella* spp. e *Proteus* spp. se encontram distribuídas no quadrante PC1 positivo e PC2 negativo.



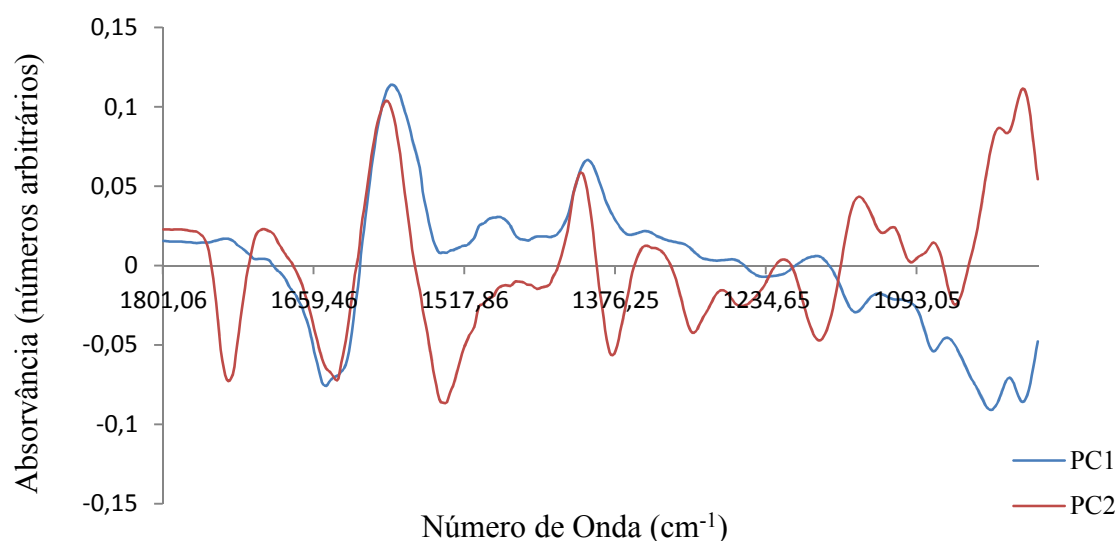


**Figura 17** – Espectros de infravermelho das diferentes *Enterobacteriaceae*.



**Figura 18** – Diagrama das coordenadas fatoriais (PC1 vs. PC2) relativo a colônias de *Salmonella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Shigella spp.* e *Proteus spp.*

Pela análise do mapa das contribuições fatoriais (Figura 19), verifica-se que as bactérias *Citrobacter* spp., *Shigella* spp. e *Proteus* spp., (PC1 positivo) se encontram caracterizadas por bandas a  $1590\text{ cm}^{-1}$  e  $1410\text{ cm}^{-1}$  que podem ser atribuídas ao alongamento simétrico e antissimétrico do ião carboxilato  $\text{COO}^-$ . As bactérias *Proteus* e *Shigella* encontram-se no PC2 negativo, o qual é caracterizado por bandas a  $1743\text{ cm}^{-1}$  que corresponde ao  $\text{C=O}$  do grupo éster em lípidos e a  $1381\text{ cm}^{-1}$  atribuível à deformação do  $\text{CH}_3$ . Os picos a  $1642\text{ cm}^{-1}$  e  $1541\text{ cm}^{-1}$  correspondem à amida I e amida II respectivamente (Movasaghi *et al.*, 2008). A distribuição das *Enterobacteriaceae* estudadas foi também influenciada pelos picos na região dos polissacarídeos ( $1300 - 950\text{ cm}^{-1}$ ).



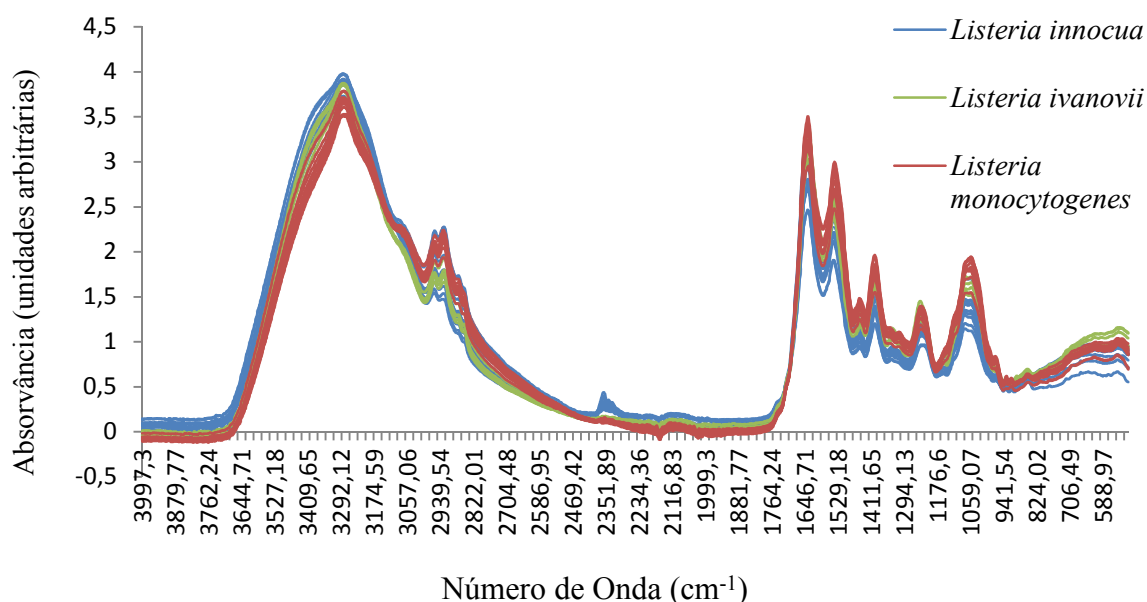
**Figura 19** – Mapa das contribuições fatoriais (PC1 vs. PC2) relativo a colónias de *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp., *Shigella* spp. e *Proteus* spp.

Verificou-se uma discriminação das diferentes colónias provenientes de vários alimentos de acordo com o género de *Enterobacteriaceae* a que pertencem (*Salmonella*, *Proteus*, *Shigella* e *Citrobacter*), recorrendo a um método rápido e pouco dispendioso, sendo assim possível discriminar os diferentes géneros de *Enterobacteriaceae* em poucos minutos (após crescimento em meio XLD), evitando desta forma a associação de possíveis infeções ao consumo de alimentos contaminados com *Salmonella* spp..

## 6.2. *Listeria monocytogenes*

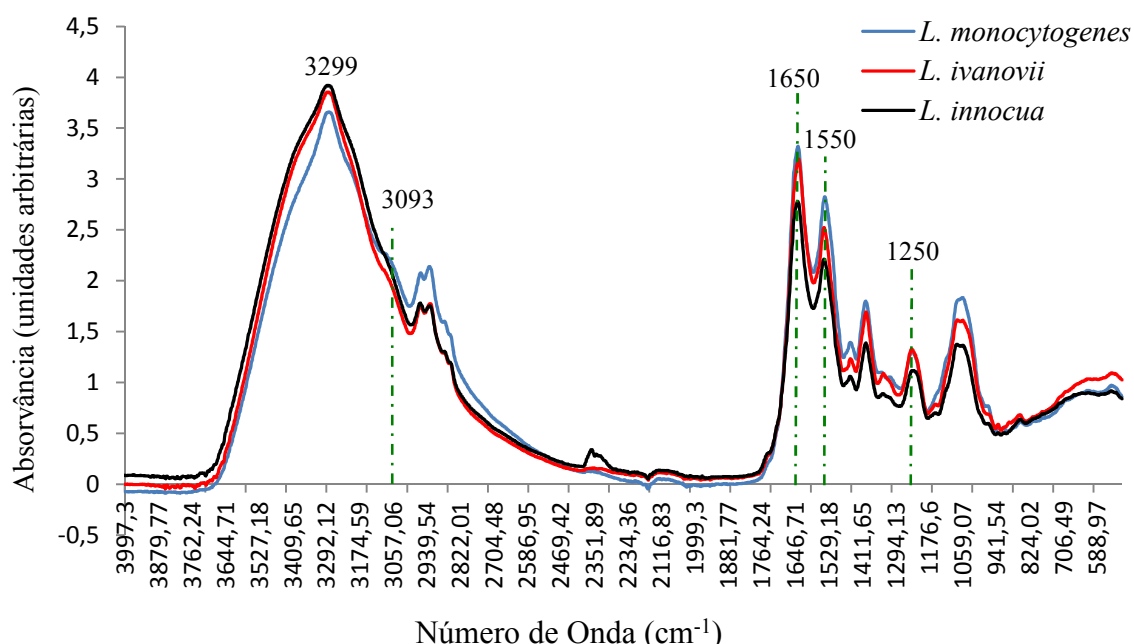
Na indústria alimentar, é importante conseguir determinar atempadamente a espécie de *Listeria* presente, uma vez que a presença de *Listeria monocytogenes* numa unidade fabril pode persistir por um longo período de tempo, e em zonas onde o processo de higienização nem sempre é eficaz. A *Listeria monocytogenes* aloja-se em nichos onde é difícil ocorrer uma penetração eficaz dos detergentes e dos desinfetantes, visto que esta adere a superfícies, tais como aço inoxidável, vidro, madeira, porcelana, ferro, plástico, poliéster, borracha e papel, e cresce numa rede denominada biofilme que a protege de condições adversas. Os biofilmes formam-se por deposição das células e adesão à superfície, colonização, formação e desenvolvimento do biofilme, com a produção de uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (polissacarídeos), proteínas e ácidos nucleicos (Lado *et al.*, 2007). Desta forma, quanto mais cedo a mesma for detetada, mais rapidamente se atua na sua erradicação, visto tratar-se de uma bactéria patogénica e invasiva para pessoas vulneráveis.

Na figura 20 encontram-se representados os espectros de *Listeria* estudados.



**Figura 20** – Espectros de infravermelho de bactérias de *Listeria*.

Na figura 21 encontram-se representados os espectros das diferentes espécies de *Listeria*. Neste caso, nota-se a principal diferença na zona entre 900 a 1200  $\text{cm}^{-1}$ , zona referente a vários tipos de ligações C-O, especialmente glúcidos. Existem, também, diferenças notórias nos picos correspondentes às Amidas I, II e III (1650, 1550 e 1250  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente) (Movasaghi *et al.*, 2008).

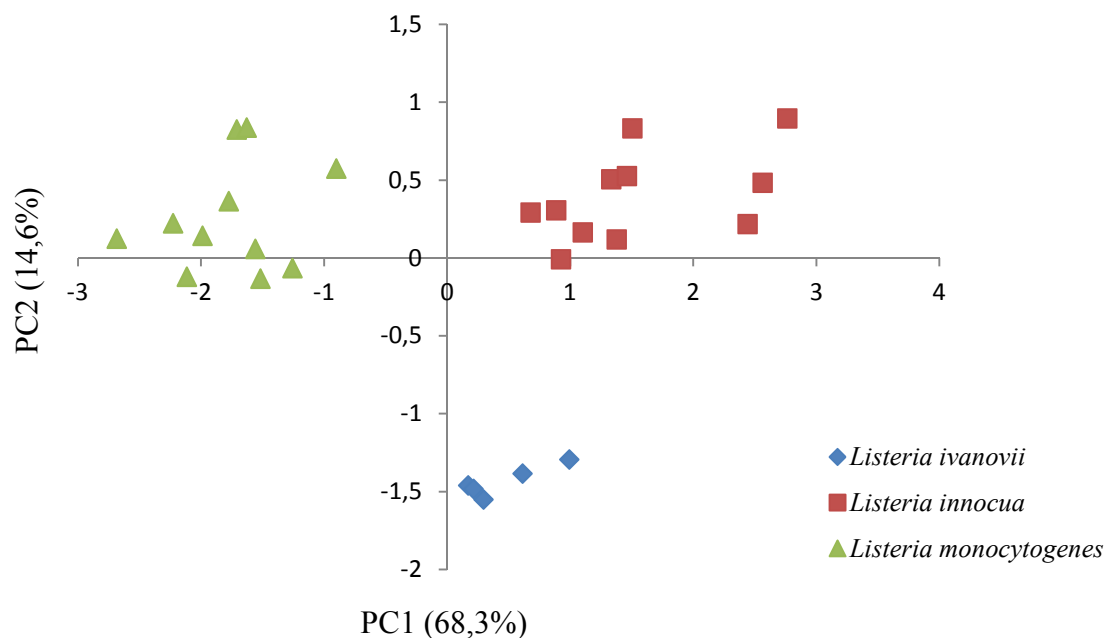


**Figura 21** – Espectros de infravermelho das diferentes espécies de *Listeria*.

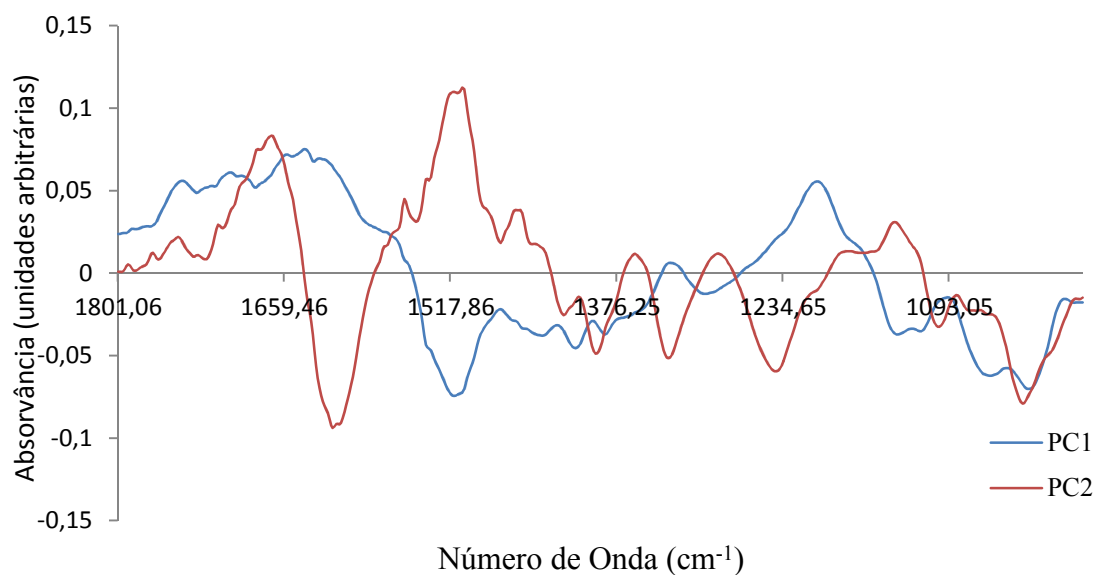
Após obtenção de espectros de *Listeria* spp. e posterior análise multivariada, observa-se no diagrama das coordenadas fatoriais (Figura 22) uma clara discriminação das diferentes espécies de *Listeria* estudadas. As amostras referentes à *Listeria monocytogenes* estão situadas no quadrante PC1 negativo e PC2 positivo, enquanto as colónias de *Listeria innocua* se encontram distribuídas no quadrante PC2 e PC1 positivo e as colónias de *Listeria ivanovii* no quadrante PC1 positivo e PC2 negativo.

Pela análise do mapa das contribuições fatoriais (Figura 23), verifica-se as bactérias que se encontram no quadrante PC1 positivo, *Listeria ivanovii* e *Listeria innocua* diferem da *Listeria monocytogenes* no que se refere à sua composição proteica (banda a 1639  $\text{cm}^{-1}$ , na zona da amidas I). Da mesma forma o PC2 separa a *Listeria innocua* da *Listeria ivanovii*

de acordo com diferenças na região da amida I e amida II, bandas a  $1675\text{ cm}^{-1}$  e  $1515\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, no caso da *Listeria innocua* no PC2 positivo (Movasaghi *et al.*, 2008).



**Figura 22** – Diagrama das coordenadas fatoriais (PC1 vs. PC2) relativo a colônias de *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* e *Listeria ivanovii*.



**Figura 23** – Mapa das contribuições fatoriais (PC1 vs. PC2) relativo a colônias de *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* e *Listeria ivanovii*.

Todas as espécies de *Listeria* possuem ainda picos na região dos polissacarídeos (1300 – 950 cm<sup>-1</sup>) que contribuem na discriminação. De facto, sabe-se que a parede celular das espécies de *Listeria* é semelhante às outras bactérias Gram positivas, sendo essencialmente composta por peptidoglicanos, ácidos teicóicos e ácidos lipoteicóicos (Wagner *et al.*, 2008).

As colónias típicas de *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii* apresentam uma coloração azul esverdeada rodeadas por um halo opaco. A coloração das colónias deve-se à clivagem de um substrato cromogénio pela enzima  $\beta$ -glucosidase existente nestas bactérias. Além disso, a lecitina de soja existente neste meio de cultura, é hidrolisada por enzimas produzidas pela *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii*, resultando desta forma na produção de um halo opaco em torno da colónia. Estas reações enzimáticas permitem distinguir as espécies patogénicas das não patogénicas (*Listeria innocua*) (Willis *et al.*, 2006). No caso da *Listeria innocua*, as colónias apresentam uma coloração esverdeada e não possuem a produção do halo opaco em torno da colónia (Willis *et al.*, 2006). No entanto, e segundo a norma ISO 11290:1-1996 a *Listeria monocytogenes* carece de confirmação bioquímica, além de que o meio OCLA não permite a distinção das espécies patogénicas. A diferenciação das espécies de *Listeria* é baseada na presença de atividade hemolítica e na fermentação de açúcares (Tabela 6) (Farber *et al.*, 1991; Seeliger *et al.*, 1984; Pita, 2012).

Neste estudo, foi possível discriminar diferentes colónias provenientes de vários alimentos de acordo com a espécie de *Listeria* a que pertencem, recorrendo a um método rápido e pouco dispendioso. É assim possível discriminar as diferentes espécies de *Listeria* em poucos minutos (após crescimento em meio OCLA), evitando a associação errada a infeções devido ao consumo de alimentos infetados com *Listeria monocytogenes*.

**Tabela 6** – Diferenciação bioquímica das espécies de *Listeria*.

	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria ivanovii</i>
“Tumbling motility”	+	+	+
β – hemólise	+	-	+
Produção de catalase	+	+	+
Produção de lipase	+	-	+
<b>Produção de ácido a partir de:</b>			
L-ramnose	+	v	-
D-xylose	-	-	+
D-manitol	-	-	-
α-methyl D-mannoside	+	+	-
<b>CAMP-test:</b>			
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-
<i>Rhodococcus equi</i>	-	-	+

+ Teste positivo; - Teste negativo; v Teste com resultado variável

## 7. Conclusões

No presente estudo, a espectroscopia de infravermelho (MIR) revelou ser um método bastante útil na confirmação de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* provenientes de amostras de produtos alimentares. Foi possível distinguir diferentes espécies de *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. ivanovii*) após crescimento em meio seletivo OCLA. É de salientar que estas bactérias possuem características diferentes em meio seletivo OCLA, pois este foi desenhado de forma a detetar todas as espécies de *Listeria*, diferenciando as patogénicas (*Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii*) de todas as outras não patogénicas (*Listeria innocua*).

Este método rápido permitiu ainda diferenciar vários géneros de *Enterobacteriaceae* (*Salmonella*, *Proteus*, *Shigella* e *Citrobacter*) com aparência semelhante após crescimento em meio XLD, requerendo-se assim uma confirmação para a determinação do género bacteriano presente num dado alimento.

Através do MIR verificou-se que, o espectro é dominado pelos picos correspondentes aos peptidoglicanos da parede celular, nomeadamente as bandas de amida I e II, e polissacarídeos que permite a diferenciação das amostras. No caso das *Enterobacteriaceae* na diferenciação parece existir uma maior variedade de factores de discriminação, lípidos, aminoácidos (grupos carboxilo). No caso da *Listeria* é normal que os seus espectros se apresentem mais semelhantes entre si, contudo diferenças na zona das amidas I e II e na zona do “fingerprint” onde se encontra a informação dos glúcidos conseguem discriminar as espécies.

As bactérias são compostas nos seus invólucros celulares por lípidos, polissacarídeos e proteínas, pelo que o MIR é indicado para diferenciar microrganismos. No global, a zona espectral utilizada encontra-se compreendida entre 1800 e 950  $\text{cm}^{-1}$ . A espectroscopia de infravermelho (MIR) tem dado evidências de sensibilidade para diferenciação de colónias bacterianas, podendo mesmo detetar diferenças na própria colónia (Choo-Smith *et al.*, 2001) o que exige um controlo extremo na homogeneização da amostra. Neste trabalho, os resultados dos ensaios com colónias mostram que é possível discrimina-las eficazmente.



Este estudo permitiu confirmar a presença de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* de uma forma simples (a amostra é colocada diretamente no acessório e amostragem), rápida e pouco dispendiosa. Assim, a técnica de espectroscopia de ATR-MIR permite identificar em poucos minutos *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* e distinguir estas bactérias de outras que também crescem nos meios de cultura selectivos usados para detetar a presença destas bactérias (XLD e OCLA, respetivamente). Esta metodologia permite reduzir o custo e tempo despendido associados à confirmação destes microrganismos em alimentos, revelando-se bastante útil na indústria alimentar.

## 8. Referências Bibliográficas

- Almann M., Hofelein C., Köppel E., Lüthy J., Meyer R., Niederhauser C., Wegmüller B. and Candrian U. (1995). Polymerase chain reaction (PCR) for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products. Elsevier. 146, 85 – 97.
- Baptista P. e Antunes C. (2005). Higiene e Segurança Alimentar na Restauração. Vol.II – Avançado, Forvisão.
- Barros A. (1999). Contribution à la sélection et comparaison de variables caractéristiques [Tese de Doutorado]. Institut Nationale Recherche Agronomique. Paris, França.
- Brereton, R. (2003). Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant. John Wiley & Sons, Ltd.
- CDC. Vital Signs: *Listeria* Illnesses, Deaths, and Outbreaks – United States, 2009 – 2011 MMWR / June 7, 2013 / Vol.62 / No.22
- CDC. What is Salmonellosis?, 2012, *Salmonella* Homepage, General Information
- CDC. Los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos son mortalmente graves: Qué puede hacer para evitarlos?, Diciembre 27, 2011
- Choo-Smith, L., Maquelin, K., Vreeswijk, T., Bruining, H., Puppels, J., Ngo Thi, L., Kirschner, C., Naumann, D., Ami, D., Orsini, F., Doglia, S., Lamfarraj, H., Sockalingum, G., Manfait, M., Allouch, P. e Endtz, H. (2001). Investigation microbial micro(colony) heterogeneity by vibrational spectroscopy. Applied Environmental Microbiology. 67, 1461 – 1469.

- Cordella, C., Moussa, I., Martel, A.-C., Sbirrazzuoli, N., e Lizzani-Cuvelier, L. (2002). Recent developments in food characterization and adulteration detection: Technique-oriented perspectives. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50, 1751 – 1764.
- Dias, A., Seixas, R., Oliveira M., Vilela, C., Serrano, M., Jaleco, A., Mareco, R., Pereira, L. (2012). Caracterização da resistência a antibióticos associada a isolados portugueses de *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5], 12:i: -, a nova estirpe pandémica. [Relatório de Investigação Aplicada II]. Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.
- Dorak, M.T. (2007). Real-Time PCR. (Ed). Bios Advanced Methods.
- EFSA. *Listeria*, June 2013 – <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/listeria.htm>
- EFSA. Monitoring of biological hazards in animals and food in the European Union – Biological Food Safety and Quality; 4 – 5 October, 2012.
- Esteves, A. (2005). Perigos microbiológicos em alheira – Principais vias de contaminação por *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp.. [Tese de Doutoramento]. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Portugal.
- Ekperigin H.E., Nagaraja K.V. (1998). Microbial food borne pathogens *Salmonella*. Pubmed. 14(1), 17 – 29.
- Farber, J.M. and Peterkin, P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. Microbiological Reviews. 476 – 511.
- Grimont, P.A.D., Griment, F., Bouve, P. (2000). Taxonomy of the genus *Salmonella*. P.1 – 17. Edited by C. Wray and A. Wray. *Salmonella in Domestic Animals*. CABI Publishing.

- Hair, J.F., Tatham, R.L., Anderson, R.E., Black, W. (1998). Análise multivariada de dados. 5<sup>a</sup> Edição. Bookman Companhia Editora. Brasil
- Helm, D., Labischinski, H., Schallen, G., e Naumann, D. (1990). Classification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal of General Microbiology*. 137, 69 – 79.
- Irudayaraj, J., Yoang, H. e Sakhamuri, S. (2002). Differentiation and detection of microorganisms using Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*. 606, 181 – 188.
- ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal Method for detection of *Salmonella* spp..
- ISO 11290-1:1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal Method for detection of *Listeria monocytogenes*.
- Jolliffe, I. (1986). Principal component analysis. 2<sup>nd</sup> Edition. Springer-Verlag. New York.
- Lado, B. H. & Yousef, A. E. (2007). Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processor, *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. 3rd edition, New York: CRC Press (158 – 198).
- Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L., Ngo-thi, N., Vreeswijk, T., Stämmler, M., Endtz, H., Bruining, H., Naumann, D. e Puppels, G. (2002). Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 41, 324 -329.
- Miettinen, M., Bjorkroth, K. J., & Korkeala, H. J. (1999). Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiology*. 46, 187.

- Monteiro, V. (2010). Higiene – Teórica e Técnicas. Higiene, Segurança, Conservação e Congelação de Alimentos, 4ª Edição Actualizada e Aumentada. Lidel – Edições Técnicas, Lda. Lisboa-Porto, Portugal.
- Moreirinha, A. (2009). Utilização da Espectroscopia de Infravermelho para análise de fiambre [Tese de Mestrado]. Universidade de Aveiro. Portugal.
- Movasaghi, Z., Rehman, S. and Rehman, I. (2008). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*. 43, 134 – 179.
- Murray, J. C. (2000). Environmental Aspects of *Salmonella*. P265-283, Edited by C.Wray and A.Wray. *Salmonella in Domestic Animals*. CABI Publishing.
- Naumann, D. Barnickel, G., Bradaczek, H., Labischinski, H. and Giesbrecht, P. (1982). Infrared spectroscopy, a tool for probing bacterial peptidoglycan. Potentialities of infrared spectroscopy for cell wall analytical studies and rejection of models based on crystalline chitin. *European Journal of Biochemistry*. 125, 505 – 515.
- Naumann, D. (1985). The ultra rapid differentiation and identification oh pathogenic bactéria using FT-IR techniques. *SPIE, Fourier and Computerized Infrared Spectroscopy*. 533, 268 – 269.
- Ngo-Thi, N.A., Kirschner, C., Naumann, D. (2003). Characterization and identification of microorganisms by FT-IR microspectrometry. *Journal of Molecular Structure*. 661 – 662, 371 – 380.
- Novais, R. (2010). Microbiologia dos Alimentos. In: Ferreira, W.F.C., Sousa, J.C.F., Lima, N. Microbiologia. Lidel – Edições Técnicas, Lda. Lisboa-Porto, Portugal. 523-549.
- NP EN ISO/IEC 17025:2005. Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração (ISO/IEC 17025:2005).

- Oust, A., Møretrø, T., Kirschner, C., Narvhus, J., Kohler, A. (2004). FT-IR spectroscopy for identification of closely related lactobacilli. *Journal of Microbiological Methods*. 59, 149 – 162.
- Pita, J. (2012). Surto de Listeriose entre 2009 e 2011 em Lisboa e Vale do Tejo – Investigação e medidas implementadas pela ASAE [Tese de Mestrado]. Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa. Portugal.
- Portaria 65/90 de 26 de Janeiro – Critérios microbiológicos a utilizar na apreciação das características dos bolos e cremes de pastelaria.
- Preisner, O., Lopes, J.A., Guiomar, R., Machado, J., Menezes, J.C. (2007). Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in bacteriology: towards a reference method for bacteria discrimination. *Anal Bioanal Chem*. 387, 1739 – 1748.
- Regulamento (CE) n.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Janeiro de 2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios.
- Regulamento (CE) 2073/2005 (Estabelece os critérios microbiológicos para certos MO e as regras de execução a cumprir pelos operadores das empresas do sector alimentar).
- Regulamento (CE) N.º 1441/2007 da comissão de 5 de Dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios.
- Regulamento (CE) 882/2004 de 29/04 (Controlos oficiais dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais).
- Regulamento (CE) 852/2004 de 29/04 (Relativo à Higiene dos Géneros Alimentícios).

Regulamento (CE) 853/2004 de 29/04 (Estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal).

Regulamento (CE) 854/2004 de 29/04 (Estabelece regras específicas de organização dos controlos oficiais aplicáveis aos alimentos de origem animal).

Ruiz-Bolivar, Z.; Poutou-Piñales, R.A.; Carrascal-Camacho, A.K. (2008). Resistência antimicrobiana y a desinfectantes de *Listeria* spp.. NOVA – Publicación Científica en Ciências Biomédicas 6(10):101-236.

Seeliger, H.P.R., Rocourt, J., Schrettenbrunner, A., Grimont, P.A.D. and Jones, D. (1984). *Listeria ivanovii* sp. nov.. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 34, 336 – 337.

Shinohara, N., Barros, V., Jimenez, S., Machado, E., Dutra, R., Filho, J. (2008). *Salmonella* spp., importante pathogenic agente transmitted through foodstuffs. Ciência Saúde Colectiva. 13(5), 1675 – 1683.

Siqueira R.S., Dodd C. E. R., Rees C. E. D. (2003). Phage amplification assay as rapid method for *Salmonella* detection. Brazilian Journal of Microbiology. Vol. 34.

Stuart, B. (2004). Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. John Wiley & Sons, Ltd., Australia.

Thorns, C. J., Woodward, M. J. (2000). Fimbriae of *Salmonella*. P.35-55. Edited by C.Wray and A. Wray. *Salmonella* in Domestic Animals. CABI Publishing.

Yu, C. e Irudayaraj, J. (2004). Spectroscopy characterization of microorganisms by Fourier transform infrared microspectroscopy. Biopolymers. 77, 368 -377.

Varella, C. (2008). Análise de Componentes Principais [Relatório de análise multivariada aplicada às ciências agrárias ]. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Brasil.

- Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J. & Kreft, J. (2001). *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clinical Microbiology Reviews*. 14 (3), 584-640.
- Vogel, B. F., Huss, H. H., Ojeniyi, B., Ahrens, P. & Gram, L. (2001). Elucidation of *Listeria* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 2586
- Wagner, M. & McLauchlin, J. (2008). Biology. In Liu, D., *Handbook of Listeria monocytogenes*. New York: CRC Press (3 – 20).
- Wenning, M., Scherer, S. (2013). Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. *Applied Microbiology Biotechnology*. 97, 7111 – 7120.
- Willis, C., Baalham, T., Greenwood, M., Presland F., (2006). Evaluation of new chromogenic agar for detection of *Listeria* in food. *Journal of Applied Microbiology*. 101, 711 – 717.
- World Health Organization Staff (1997). Guidelines for Drinking-Water Quality, Surveillance and Control of Community Supplies. 2<sup>nd</sup> Edition, Vol. 3, Geneva.
- World Health Organization Staff (2008). Guidelines for Drinking-Water Quality, Incorporing 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> addenda. Vol.1 Recommendations. Geneva
- <http://en.convdocs.org/docs/index-52279.html> – Consultado a 14 de Setembro de 2013.
- [http://foodmicrobiologee.blogspot.pt/2012\\_08\\_01\\_archive.html](http://foodmicrobiologee.blogspot.pt/2012_08_01_archive.html) - Consultado a 14 de Setembro de 2013.



<http://loudoun.nvcc.edu> – Consultado a 14 de Setembro de 2013.

<http://microtradeuk.com/products.php> – Consultado a 13 de Setembro de 2013.

[http://pictures.life.ku.dk/atlas/microatlas/veterinary/plating\\_media/BPLS/](http://pictures.life.ku.dk/atlas/microatlas/veterinary/plating_media/BPLS/) – Consultado a 13 de Setembro de 2013.

[www.bbcorp.co.kr/index.php?mm\\_code=112&sm\\_code=121](http://www.bbcorp.co.kr/index.php?mm_code=112&sm_code=121) – Consultado a 15 de Setembro de 2013.

[www.biogerm.pt](http://www.biogerm.pt) – Consultado a 13 de Setembro de 2013.

[www.biomerieux.pt](http://www.biomerieux.pt) – Consultado a 04 de Outubro de 2013.

[www.biomerieux-industry.com](http://www.biomerieux-industry.com) – Consultado a 15 de Setembro de 2013.

[www.microbes-edu.org/professional/diag/listeria.html](http://www.microbes-edu.org/professional/diag/listeria.html) – Consultado a 15 de Setembro de 2013.

[www.oxid.com](http://www.oxid.com) – Consultado a 14 de Setembro de 2013.

[www.pvl.pt](http://www.pvl.pt) – Consultado a 14 de Setembro de 2013.

[www.tgw1916.net/Tests/api.html](http://www.tgw1916.net/Tests/api.html) – Consultado a 14 de Setembro de 2013.

[www.uaz.edu.mx/histo/pathology/ed/ch\\_9b/path/oxidase.htm](http://www.uaz.edu.mx/histo/pathology/ed/ch_9b/path/oxidase.htm) – Consultado a 14 de Setembro de 2013.